

**Bleiziffer Cristina-Ramona**

# **Aplicații biomedicale și controlul unor alimente prin GC-MS**



**Presa Universitară Clujeană**

**CRISTINA-RAMONA BLEIZIFFER**

**APLICAȚII BIOMEDICALE  
ȘI CONTROLUL UNOR ALIMENTE  
PRIN GC-MS**

***Referenți științifici:***

**Prof. univ. dr. Adela Pinte**  
**CS I dr. Dana Alina Magdaș**

**ISBN 978-606-37-0589-2**

© 2019 Autoarea volumului. Toate drepturile rezervate.  
Reproducerea integrală sau parțială a textului, prin orice mijloace, fără acordul autoarei, este interzisă și se pedepsește conform legii.

**Tehnoredactare computerizată: Alexandru Cobzaș**

**Universitatea Babeș-Bolyai**  
**Presa Universitară Clujeană**  
**Director: Codruța Săcelean**  
**Str. Hasdeu nr. 51**  
**400371 Cluj-Napoca, România**  
**Tel./fax: (+40)-264-597.401**  
**E-mail: editura@editura.ubbcluj.ro**  
**<http://www.editura.ubbcluj.ro/>**

**CRISTINA-RAMONA BLEIZIFFER**

**APLICAȚII BIOMEDICALE  
ȘI CONTROLUL UNOR ALIMENTE  
PRIN GC-MS**

**PRESA UNIVERSITARĂ CLUJEANĂ**

**2019**



# Cuprins

Prefață .....	9
Capitolul I. Spectrometria de masă .....	11
1.1. Noțiuni generale .....	11
1.2. Sisteme de introducere .....	15
1.3. Moduri de ionizare utilizate în spectrometria de masă .....	15
1.3.1. Ionizarea prin impact electronic .....	16
1.3.2. Ionizarea chimică .....	17
1.4. Analizoare de masă .....	18
1.4.1. Spectrometrul de masă cu analizor cuadrupolar .....	18
1.4.2. Spectrometrul de masă cu analizor cu trapă de ioni .....	20
1.5. Tipuri de detectori .....	21
1.6. Înregistrarea și achiziția datelor MS. Modul de lucru .....	22
1.7. Prelucrarea datelor MS .....	23
1.8. Aplicații medicale ale spectrometriei de masă .....	23
Capitolul II. Cromatografia de gaze .....	27
2.1. Principiul de bază al cromatografiei de gaze .....	27
2.2. Modelul teoretic al cromatografiei de gaze .....	29
2.3. Tipuri de detectori utilizați în cromatografia de gaze .....	31
2.3.1. Detectorul cu ionizare în flacără .....	32
2.3.2. Detectorul termoionic .....	33
2.3.3. Detectorul cu captură de electroni .....	34
2.4. Cuplajul cromatograf de gaze-spectrometru de masă .....	36
Capitolul III. Validarea metodelor de analiză .....	39
3.1. Criterii de validare .....	39

Capitolul IV. Analiza prin GC-MS și diluție izotopică a aminoacizilor și acizilor grași din vinuri .....	45
4.1. Aminoacizii .....	45
4.2. Acizii grași .....	47
4.3. Vinul și efectele sale benefice asupra organismului uman .....	50
4.4. Obiectivul studiului.....	51
4.5. Materiale și metode .....	51
4.5.1. Reactivi și probe biologice.....	51
4.5.2. Extracția aminoacizilor și a acizilor grași din vinuri.....	52
4.5.3. Reacții de derivatizare .....	52
4.5.3.1. Derivatizarea aminoacizilor .....	52
4.5.3.2. Derivatizarea acizilor grași .....	53
4.5.4. Aparatura experimentală .....	53
4.5.5. Calculul cantitativ al aminoacizilor.....	54
4.5.6. Calculul cantitativ al acizilor grași.....	57
4.6. Rezultate și discuții.....	58
4.7. Concluzii.....	69
Capitolul V. Analiza prin GC-MS și diluție izotopică a aminoacizilor din semințe .....	71
5.1. Efectele benefice ale extractelor din semințe asupra organismului uman ....	71
5.2. Obiectivul studiului.....	75
5.3. Materiale și metode .....	75
5.3.1. Reactivi și probe biologice.....	75
5.3.2. Extracția aminoacizilor din semințe .....	75
5.3.3. Derivatizarea aminoacizilor .....	76
5.4. Aparatura experimentală .....	76
5.5. Rezultate și discuții.....	77
5.6. Concluzii.....	81
Capitolul VI. Analiza prin GC-MS și diluție izotopică a aminoacizilor din plante .....	83
6.1. Efectele benefice ale extractelor din plante asupra organismului uman .....	83
6.2. Obiectivul studiului.....	88

6.3.	Materiale și metode .....	89
6.3.1.	Reactivi și probe biologice.....	89
6.3.2.	Extracția aminoacizilor din plante.....	89
6.3.3.	Derivatizarea aminoacizilor .....	89
6.4.	Aparatura experimentală .....	89
6.5.	Rezultate și discuții.....	90
6.6.	Concluzii.....	99
Capitolul VII. Optimizarea diagnosticării din analize de sânge utilizând metode statistice (chemometrie).....		101
7.1.	Metode de chemometrie aplicate pentru analiza datelor clinice .....	101
7.2.	Obiectivul studiului.....	103
7.3.	Materiale și metode .....	103
7.3.1.	Reactivi și probe biologice.....	103
7.4.	Partea experimentală.....	105
7.5.	Rezultate și discuții.....	114
7.6.	Concluzii.....	121
Concluzii generale .....		123
Anexa 1 .....		125
Bibliografie.....		127





# Prefață

Prezenta carte abordează un domeniu de interes, atât sub aspect fundamental cât și aplicativ și anume, aplicații ale tehnicii GC-MS în studiul unor compuși de interes biologic, benefici pentru sănătatea umană. Astfel, această carte poate fi de un real interes atât pentru studenții, masteranzii și doctoranzii unor discipline cum ar fi: fizică, chimie, știința alimentelor, dar și pentru publicul larg prin conținutul de informații nutriționale de actualitate pentru care există în acest moment o preocupare tot mai largă din partea consumatorilor.

Astfel, primele trei capitole conțin considerații teoretice referitoare la familiarizarea cititorului cu noțiunile generale ale spectrometriei de masă și anume: principiul de bază al cromatografiei de gaze, prezentarea a trei dintre cele mai utilizate tipuri de detectori în cromatografia de gaze (detectorul cu ionizare în flacără, detectorul termoionic și detectorul cu captură de electroni) și respectiv, cuplajul GC-MS. Nu în ultimul rând, acest capitol prezintă și noțiuni teoretice legate de validarea metodelor analitice și stabilirea parametrilor de performanță ai acestora.

Partea a doua conține rezultate originale obținute de autoare în cursul perioadei doctorale. Astfel, este descrisă dezvoltarea și validarea unei metode de analiză a aminoacizilor și a acizilor grași din vinuri, prin GC-MS cu diluție izotopică. Metoda astfel dezvoltată a fost ulterior aplicată în cadrul unui studiu ce a avut ca principal scop compararea a șase vinuri albe din podgoria Blaj, în ceea ce privește caracteristicile acestora și aminoacizii liberi. O altă metodă a cărei dezvoltare și validare este prezentată în detaliu este cea de analiză a aminoacizilor din semințe, prin GC-MS cu diluție izotopică, alături de compararea conținutului de aminoacizi precum și a activității antioxidante a unor semințe (în, mac, struguri, cânepă, nuci, dovleac, susan, pepene verde, chia, porumb, migdale și alune), utilizate ca suplimente alimentare. Pentru aminoacizii esențiali s-au obținut valori semnificative în cazul semințelor de pepene verde (datorită conținutului ridicat al histidinei) urmată de cânepă, dovleac, migdale, mac și semințe de struguri. Cea mai mare activitate antioxidantă s-a dovedit a o avea semințele de struguri, de nuci și de cânepă.

Un alt subiect de interes tratat în cadrul acestei cărți este reprezentat de diferențierea unor plante aromatice, achiziționate din România (folosite adesea ca ceai sau condimente), din punctul de vedere al aminoacizilor prezenți în aceste plante. Colateral s-a determinat și comparat conținutul de substanțe volatile și activitatea antioxidantă în plante

medicinale: chimen, busuioc, soc, păpădie, tătăneasă, ghimbir, păducel, lămâiță, rostopască, cimbri or, artemisia, mentă, curry, salvie, rozmarin, urzică.

Ultimul capitol al prezentei lucrări evidențiază eficacitatea aplicării metodelor chemometrice în optimizarea diagnosticării, pe baza analizelor de sânge. În acest scop, metodele statistice utilizate au fost Analiza Cluster (CA) și Analiza Componentelor Principali (PCA). Metodele statistice au fost aplicate, în cadrul acestui studiu, pentru a diferenția pacienții (cazurile) în funcție de sex, vârstă și diagnostic. Corelațiile obținute între enzimele transaminazice, uree și VSH, Ca, Mg, acid uric, creatinină confirmă faptul că, analizele clinice combinate cu metodele chemometrice sunt utile în interpretări legate de diagnosticare și tratament.

Lucrarea este redactată îngrijit, atât sub aspectul limbajului cât și al graficii utilizate, prezentând logic și plăcut atât partea de considerații teoretice cât și cea de rezultate originale. De remarcat este și faptul că, la realizarea acestei lucrări s-a utilizat un amplu și relevant material bibliografic.

Experimentele prezentate s-au desfășurat în Laboratorul de Gaz Cromatografie și Spectrometrie de Masă din cadrul departamentului de Fizica Biomedicală al Facultății de Fizică de la Universitatea Babeș Bolyai din Cluj-Napoca.

CS I Dr. Dana Alina Magdas

# Capitolul I

## Spectrometria de masă

### 1.1. Noțiuni generale

Spectrometria de masă (MS) este azi una din cele mai utilizate tehnici în analiza cantitativă. Specificitatea, selectivitatea și limita de detecție sunt caracteristicile importante inegalabile, care alături de dezvoltarea deosebită din domeniu, fac ca această tehnică să se aplice în fizica atomică, fizică și cinetica reacțiilor, geocronologie, în toate domeniile analitice [6], [1].

În ultimele decenii, dezvoltarea metodelor de ionizare, noile analizoare capabile să crească specificitatea prin spectrometrie tandem (MS/MS), măsurători de masă exactă, alături de GC-MS, au condus la cercetări interesante în domenii interdisciplinare, chimie, mediu, controlul alimentelor, biologie și medicină. Aplicațiile importante sunt în domeniile biologiei și medicinei. Relevanța deosebită a metodei MS cantitative este dată de importanța pe care o are în domeniul cercetării pentru sănătate.

Începând cu studiile lui J.J. Thomson (1912), s-a continuat cu revoluționarea studiilor volatilelor la apariția cuplajului (1958) cromatograf de gaze – spectrometru de masă (GC-MS) și a urmat apoi revoluționarea în studiul nevolatilelor (1980) ca peptide, oligozaharide, fosfolipide, acizi biliari. Prin descoperirea noilor tehnici de ionizare electrospray, desorbției laser asistată de matrice (MALDI), compușii cu masă moleculară de sute de mii de daltoni, ca polimerii sintetici, proteinele, glicanii (polizaharide), polinucleotidele, au putut fi analizați prin spectrometrie de masă.

Spectrometria de masă tandem și cuplată cu alte tehnici de separare cum sunt cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) sau electroforeza capilară (EC), dau posibilitatea obținerii de informații despre amestecuri naturale sau sintetice.

Spectrometria de masă utilizează diferența între rapoartele masă-pe-sarcină ( $m/z$ ) ale atomilor sau moleculelor ionizate pentru a le separa. Ca atare, spectrometria de masă este utilizată pentru determinarea cantitativă a atomilor sau moleculelor și de asemenea pentru determinări structurale complexe ale componentilor de interes. Moleculele au căi de fragmentare distincte care dau informații structurale pentru identificarea componentilor. Analizorii cei mai utilizați sunt cei care folosesc câmp electric sau magnetic pentru a aplica o forță asupra particulelor încărcate (ioni). Relația dintre forță, masă și câmpul aplicat se poate rezuma la aplicarea legii a doua a lui Newton și a forței Lorentz:

$$\vec{F} = m \times \vec{a} \text{ (legea a doua a lui Newton)} \quad (1.1)$$

$$\vec{F} = e(\vec{E} + \vec{v} \times \vec{B}) \text{ (legea forței Lorentz)} \quad (1.2)$$

unde:

$\vec{F}$  = forța aplicată ionului,

$m$  = masa ionului,

$\vec{a}$  = accelerația,

$e$  = sarcina ionului,

$\vec{E}$  = câmpul electric

$\vec{v} \times \vec{B}$  = vectorul produs de viteza ionului și câmpul magnetic aplicat

Din legea a doua a lui Newton se vede ca forța cauzează o accelerație dependentă de masă, iar legea forței Lorentz ne spune că forța aplicată este de asemenea dependentă de sarcina ionului. Așadar, spectrometrele de masă separă ioni în funcție de raportul masă-pe-sarcină ( $m/z$ ) și nu doar în funcție de masă [1].

În timp ce radicalii și moleculele neutre sau încărcate negativ sunt eliminate de pompele de vid, ionii pozitivi sunt accelerați de o diferență de potențial  $V$  către analizor. Acest lucru se realizează prin punerea sursei de ioni la un potențial ridicat (3kV) și menținerea restului aparatului la potențial zero. Energia potențială a unui ion de sarcină  $e$ ,  $eV$ , va fi egală cu energia cinetică a ionului după accelerare.

$$eV = \frac{mv^2}{2} \quad (1.3)$$

unde  $m$ ,  $e$  și  $v$  reprezintă masa, sarcina și respectiv viteza ionului (uzual de ordinul a 100 km/s).

În cazul spectrometrului de masă cu analizor magnetic, deflexia în câmp magnetic a maselor încărcate este dată de mărimea tensiunii de accelerare ( $V$ ) și a câmpului magnetic ( $B$ ).

$$evB = mv^2/r \text{ sau } mv = eBr \quad (1.4)$$

În câmp magnetic, asupra ionului în mișcare acționează o forță centripetă (forța Lorentz)  $F = evB$ , care este contrabalansată de forța centrifugă  $mv^2/r$ .

Calculând avem  $mv^2 = 2eV$ ,  $v^2 = 2eV/m$  care înlocuit în  $m^2v^2 = e^2B^2r^2$  dă relația (1.5).

Pentru a focaliza un ion la detector trebuie satisfăcută ecuația generală (care rezultă din ecuațiile de mai sus)

$$\frac{m}{e} = \frac{B^2r^2}{2V}, \quad (1.5)$$

$$r^2 = \frac{2mV}{B^2e}. \quad (1.6)$$

Spectrometria de masă este una dintre cele mai importante metode fizice de analiză. Ea se bazează pe ionizarea și fragmentarea moleculelor, ca urmare a unei acumulări de energie ce provoacă ruperea legăturilor interatomice. Fragmentele care se formează (ionii) sunt accelerate în interiorul unui câmp care le separă în funcție de raportul lor  $m/z$  (masa/sarcina electrică). Ionii astfel separați ajung la detector unde sunt transformați în semnale electrice proporționale cu numărul de ioni, permițând înregistrarea spectrului de masă caracteristic fiecărei substanțe organice.

Spectrometria de masă este o metodă care permite obținerea ionilor, separarea acestora în funcție de raportul dintre masă și sarcină ( $m/z$ ), înregistrarea lor, obținându-se spectrele de masă ale unor molecule complexe. Aplicațiile analitice ale spectrometriei de masă sunt foarte generale: analize structurale complexe, studiul căilor de fragmentare, identificarea și analiza cantitativă a compușilor unui amestec complex, analize calitative și cantitative de mare precizie, care se aplică, la cantități foarte mici, în urme (trace analysis).

Tehnică de analiză ce aplică legile fizicii pentru caracterizarea materiei, spectrometria de masă s-a născut la începutul secolului trecut și a deservit în primele decenii fizica: determinări de masă exactă a atomilor, potențiale de ionizare, măsurători izotopice. Termenul de spectrometrie de masă a apărut în literatura științifică în anul 1920 când F.W. Aston a raportat prima dată masa atomică exactă a neonului 20 și a neonului 22. Acest fapt venea după ce Wien, în 1898 a vizualizat deflexia razelor pozitive în câmp electric și magnetic, iar Sir J.J. Thomson a descoperit în 1912 izotopii neonului, confirmând ceea ce F. Soddy sugerase ceva mai devreme. Aceste descoperiri s-au soldat cu premiul Nobel și au pus bazele unui nou domeniu al științei.

La început spectrometria de masă, prin metodele fizicii a deservit fizica și chimia, contribuind la:

- catalogarea izotopilor elementelor
- măsurarea maselor exacte ale elementelor
- determinarea potențialelor de ionizare, a potențialelor de apariție, a energiilor de legătură
- determinarea structurii moleculelor.

Dezvoltarea spectroscopiei UV, IR, RMN, a defavorizat spectrometria de masă, care era mai complexă, mai scumpă și mai dificil de mânuit. Acuratețea și sensibilitatea ridicată a spectrometriei de masă au făcut ca aceasta să fie utilizată mai ales în analize cantitative de urme și în determinarea izotopilor stabili. Compararea informațiilor obținute prin spectrometrie de masă și prin alte metode spectroscopice arată că spectrometria de masă nu suplinește alte tehnici spectroscopice, ci le completează. Ea nu indică ce grupe

funcționale sunt prezente sau lipsesc în moleculă-informații ușor obținute din UV și IR – ci mai degrabă care sunt și cum se leagă grupările funcționale în moleculă [1].

Un aspect important al spectrometriei de masă este cantitatea mică de probă necesară pentru obținerea spectrului de masă și putem spune că această tehnică dă cea mai mare cantitate de informații specifice per microgram, comparativ cu alte metode experimentale.

În figura de mai jos este prezentată schema de principiu a unui spectrometru de masă.

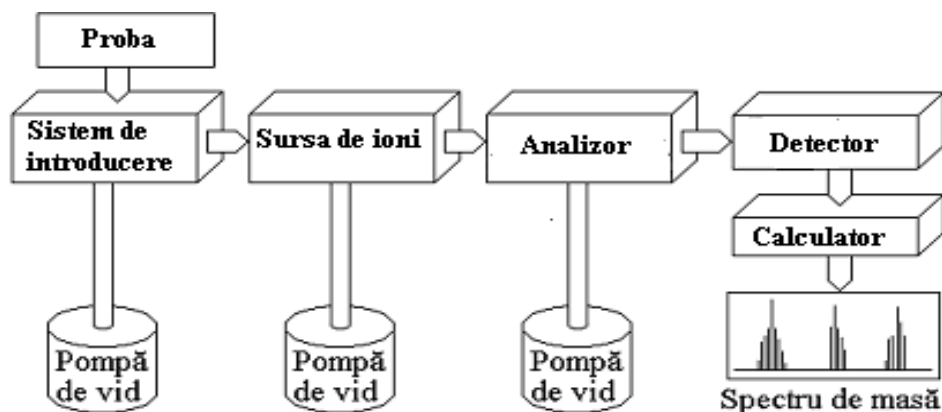


Fig. 1.1. Schema de principiu a unui spectrometru de masă [1]

Proba este introdusă în cantitatea și forma corespunzătoare în sistemul de introducere a probei.

Producerea fasciculului de ioni din substanța de analizat adusă sub formă de vapori are loc în incinta sursei de ioni.

Separarea ionilor în funcție de masă (în funcție de raportul masă pe sarcină,  $m/z$ ) are loc în analizor.

Înregistrarea abundenței relative sau intensitatea funcție de masă, se realizează de către detector.

Un computer, care procesează datele, înregistrează spectrul de masă în forma potrivită și controlează instrumentul.

Deoarece compușii analizați se află în concentrații extrem de mici (de ordinul nanogramelor sau picogramelor) este necesară crearea unui vid atât în sistemul de introducere cât și în sursa de ioni și în analizor ( $10^{-6}$  torr) pentru ca procesul de analiză al probei să nu fie influențat de prezența moleculelor din aer [1].

## 1.2. Sisteme de introducere

Analiza unei substanțe prin spectrometrie de masă presupune introducerea unor probe gazoase, lichide sau solide în sursa de ioni a acestuia.

### a) Sisteme de introducere pentru gaze

Acest sistem utilizează rezervoare încălzite sau reci, iar proba trece în spectrometru printr-o duză, gazele putând fi determinate cantitativ prin măsurarea presiunii.

### b) Sisteme de introducere pentru lichide

Pentru substanțele lichide proba trebuie trecută în faza de vapori prin încălzire și introdusă în sursa de ioni. *Sistemele de introducere pentru lichide* au un rezervor auxiliar din care proba curge printr-o conductă mică (capilar, duză, robinet de reglare) în sursa de ioni a spectrometrului. Se mai numesc *sisteme de referință* deoarece se utilizează pentru introducerea *probelor de referință*.

### c) Sisteme de introducere pentru solide

Probele solide se introduc foarte aproape de sursa de ioni cu o tijă prevăzută cu un creuzet din material inert (aur sau sticlă) cu posibilitatea de încălzire până la 400 °C. După atingerea vidului preliminar, tijă se introduce până la capăt în sursa de ioni.

### d) Sisteme de introducere pentru amestecuri complexe

Prin instalația care se realizează cuplând ieșirea unui cromatograf cu sursa de ioni a unui spectrometru, cromatograful poate fi considerat ca un sistem special de introducere a probelor. Cuplajul cromatograf – spectrometru de masă este util atunci când probele de analizat sunt amestecuri de substanțe organice, numărul de componente putând fi de peste 100. În acest cuplaj, cromatograful realizează separarea completă a componentelor amestecului, iar spectrometrul de masă identifică, pe baza spectrelor de masă, componentele astfel separate.

## 1.3. Moduri de ionizare utilizate în spectrometria de masă

Analizorul de masă lucrează numai cu particule încărcate electric precum sunt ionii creați din atomi sau molecule și, mai rar, din radicali, amfiioni sau clusteri. Modul de ionizare influențează foarte mult calitatea datelor obținute iar alegerea lui se face în funcție de proprietățile fizico-chimice ale analitului de interes: volatilitate, masă moleculară, labilitate termică, complexitatea matricei [1, 10, 11].

În cuplajul GC-MS, modurile convenționale de ionizare sunt cel prin impact electronic (*EI – electron impact*) și ionizare chimică (*CI – chemical ionization*). Primul tip de ionizare a dus la obținerea spectrelor de masă prezentate în partea experimentală a acestei lucrări.



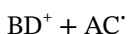
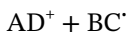
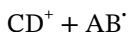
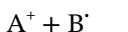
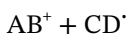
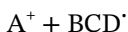
### 1.3.1. Ionizarea prin impact electronic

În cazul ionizării prin impact electronic, analitul trebuie adus în stare gazoasă – lucru realizat de către orice sistem de introducere potrivit pentru evaporarea probei [1, 11].

Moleculele de analit intră în camera de ionizare, prin partea terminală a coloanei cromatografice capilare sau prin introducerea directă, în care există un vid înalt de cca.  $10^{-7}$  torr. Aici, moleculele se ciocnesc cu un fascicul îngust de electroni, perpendicular pe direcția lor de zbor, generat de un catod (filament de Re sau W încălzit în vid de un curent de 50–200 mA). Electronii sunt accelerați la o diferență de potențial de 10–100 eV. Majoritatea spectrelor de masă din biblioteci de spectre sunt realizate la 70 eV.

Energia necesară pentru ionizarea unei molecule organice sau pentru ruperea unei legături covalente este de ordinul a 10 eV. Spectrele de masă se obțin însă, folosind fluxuri de electroni cu energii de 50–70 eV. Acest exces de energie face ca moleculele să sufere, pe lângă ionizare, o serie de fragmentări și transpoziții. Multe dintre aceste fragmente au sarcină pozitivă și sunt de mare importanță în spectrometria de masă.

În cazul unei molecule ipotetice ABCD, formarea diferitelor tipuri de ioni poate fi reprezentată schematic astfel [2,12]:



Prin ciocnirea unei molecule cu un electron se produce *ionul molecular* astfel:



Numărul ionilor și natura fragmentelor sunt caracteristice fiecărei substanțe în condiții experimentale standard, reproductibile. Spectrul de masă reprezintă astfel o „amprentă” cu ajutorul căreia se poate identifica molecula analizată.

Prin acest tip de ionizare se produc ioni pozitivi, însă se formează și ioni negativi, astfel [1]:

- captura electronului prin rezonanță:



- captura electronului prin rezonanță disociativă:



- formarea perechilor de ioni:



Anionii au însă masă mică și sunt fără valoare interpretativă (randament  $\sim 10^{-4}$  din randamentul ionilor pozitivi) [1]. Ionii negativi formați în camera de ionizare sunt atrași de un electrod pozitiv, neutralizați și evacuați cu ajutorul pompelor de vid.

Ionizarea prin impact electronic se caracterizează prin stabilitate, sensibilitate mare și printr-o foarte bună reproductibilitate – ceea ce a determinat stocarea informațiilor în biblioteci de spectre de masă.

### 1.3.2. Ionizarea chimică

Spre deosebire de ionizarea prin impact electronic, ionizarea chimică este mai blândă, necesitând energii mai mici [1]. Experimental, se constată că spectrele obținute prin ionizare EI sunt mai bogate în picuri (ioni) față de spectrele mai simple și mai ușor de interpretat obținute prin ionizarea chimică.

În cazul acestui tip de ionizare, moleculele probei (aflată în stare gazoasă) se introduc în camera de ionizare împreună cu un gaz reactiv (ex. metan, izobutan, amoniac), într-o cantitate mare în raport cu proba. Presiunile lor parțiale sunt de  $10^{-6}$  torr pentru proba analizată și de 0.3 – 3 torr, pentru gazul reactiv.

Acest amestec este bombardat de un fascicul de electroni care va ioniza și fragmenta numai moleculele de gaz reactiv, aflat în proporție mult mai mare decât proba. Ionii rezultați din gazul reactiv vor reacționa cu moleculele probei, ionizându-le. Ionii protonați  $MH^+$  sunt cei mai abundenți din spectrul de masă. Informația obținută cu acest tip de ionizare este masa moleculară a analitului.

## 1.4. Analizoare de masă

### 1.4.1. Spectrometrul de masă cu analizor cuadrupolar

Analizorul cuadrupolar a fost inventat în anul 1950 de către Wolfgang Paul. O altă inovație adusă de Paul este și analizorul cu trapă de ioni. Prima trapă ionică a devenit disponibilă comercial în anul 1983. Pentru contribuțiile sale, în anul 1989, lui Paul i s-a decernat Premiul Nobel în Fizică.

Analizorul de masă cuadrupolar liniar este alcătuit din patru electrozi de tip tijă (sau bară), de formă cilindrică sau hiperbolică (Fig. 1.2), orientați în direcția axei  $z$ , și amplasați într-o configurație pătratică în planul  $xy$ . Perechile de electrozi opuși sunt menținute la același potențial alcătuit dintr-o componentă de curent continuu și o componentă de curent alternativ (Fig. 1.3).

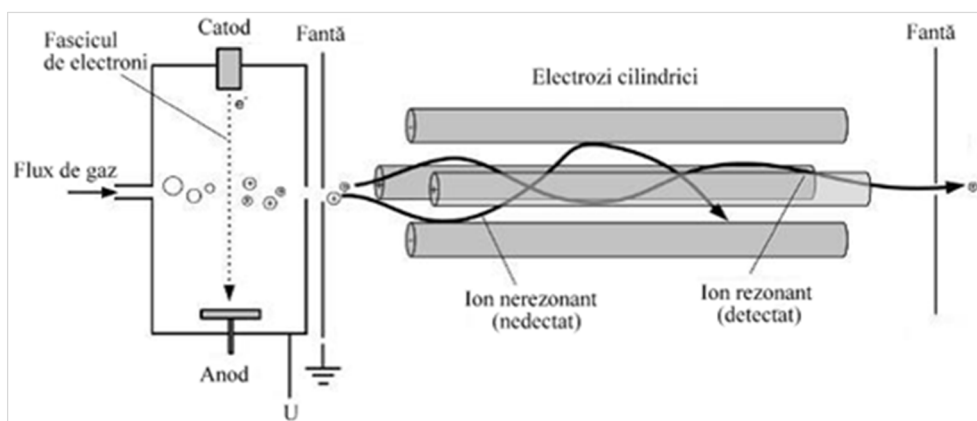


Fig. 1.2. Analizorul de masă cuadrupolar.

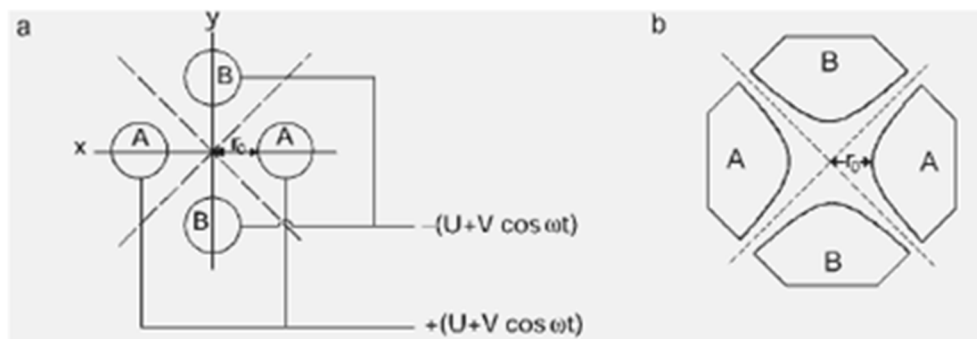


Fig. 1.3. Secțiune transversală prin analizorul cuadrupolar liniar:  
a) în aproximația cilindrică; b) electrozi hiperbolici.

Câmpul electric este 0 de-a lungul liniilor punctate. (sursa: [3]).

În momentul în care un ion pătrunde în interiorul ansamblului cuadropolar, de-a lungul axei  $z$ , o forță de atracție se exercită asupra sa din partea uneia dintre tije. Dacă tensiunea aplicată barelor este periodică, atracția și repulsia în ambele direcții  $x$  și  $y$  sunt alternative în timp, pentru că și semnul forței electrice variază periodic. Dacă tensiunea aplicată se compune dintr-o tensiune continuă  $U$  și o tensiune de radiofrecvență  $V$ , potențialul total  $\Phi_0$  este dat de relația:

$$\Phi_0 = U + V \cos \omega t \quad (1.11)$$

Astfel, ecuațiile de mișcare sunt:

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{e}{m_i r_0^2} (U + V \cos \omega t) x = 0 \quad (1.12)$$

$$\frac{d^2y}{dt^2} - \frac{e}{m_i r_0^2} (U + V \cos \omega t) y = 0 \quad (1.13)$$

În cazul câmpurilor electrice neomogene, cum este și cazul de mai sus, există o forță medie mică, întotdeauna în direcția câmpului cu valoare mai joasă. Câmpul electric este zero de-a lungul liniilor punctate din Fig. 1.3. Prin urmare, este posibil ca un ion să traverseze cuadropolul fără a lovi tije, cu condiția ca mișcarea sa în jurul axei  $z$  să fie stabilă și cu amplitudini limitate în planul  $xy$ . O astfel de condiție derivă din teoria ecuațiilor Mathieu.

Rescriind ecuațiile de mai sus în forma adimensională, acestea devin:

$$\frac{d^2x}{d\tau^2} + (a_x + 2q_x \cos 2\tau)x = 0 \quad (1.14)$$

$$\frac{d^2y}{d\tau^2} + (a_y + 2q_y \cos 2\tau)y = 0, \quad (1.15)$$

unde:

$$a_x = -a_y = \frac{4eU}{m_i r_0^2 \omega^2}, \quad q_x = -q_y = \frac{2eV}{m_i r_0^2 \omega^2} \text{ și } \tau = \frac{\omega t}{2} \quad (1.16)$$

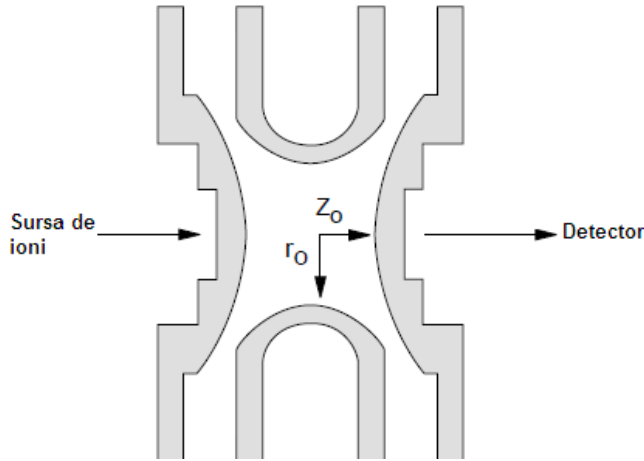
Pentru un set dat de valori  $U$ ,  $V$  și  $\omega$ , mișcarea ionilor poate avea o traiectorie stabilă, ceea ce va determina ca ionii cu o anumită valoare  $m/z$  sau dintr-un domeniu de valori  $m/z$  să străbată cuadropolul. Ionii ce oscilează pe distanța  $2r_0$  dintre electrozi vor avea traiectorii stabile. Domeniul de stabilitate a unui ion particular este determinat de mărimea tensiunii de radiofrecvență  $V$  și de raportul  $U/V$ .

Reprezentând parametrul  $a$  în funcție de  $q$ , se obține diagrama de stabilitate a câmpului cuadropolar bidimensional, care prezintă trei regiuni de interes: I) ambele traiectorii  $x$  și  $y$  sunt stabile; II) una dintre traiectoriile  $x$  sau  $y$  este stabilă; III) nici una dintre traiectorii nu este stabilă.

Analizorul cuadropolar se comportă de fapt ca un filtru de masă, de unde și denumirea de *filtru de masă cuadropolar*.

### 1.4.2. Spectrometrul de masă cu analizor cu trapă de ioni

Analizorul de masă cu trapă de ioni constă din doi electrozi cu formă hiperbolică, dispuși ca și capace, și un electrod circular care înlocuiește două dintre tijele analizorului cuadrupolar (Fig. 1.4). Privit în secțiune, în planul  $rz$ , analizorul cu trapă de ioni se aseamănă cu cel cuadrupolar cu tije hiperbolice. Electrozii-capac sunt conectați electric iar un potențial continuu și de radiofrecvență se aplică între aceștia și electrodul circular [2].



**Fig. 1.4.** Analizorul de masă cu trapă de ioni.

Spre deosebire de cazul analizorului cuadrupolar, pentru analizorul cu trapă de ioni, câmpul electric este considerat tridimensional și se exprimă în sistemul de coordonate cilindrice:

$$\Phi(x, y, z) = \frac{\Phi_0}{r_0^2} (r^2 \cos^2 \theta + r^2 \sin^2 \theta - 2z^2) \quad (1.17)$$

Deoarece:  $\cos^2 \theta + \sin^2 \theta = 1$ , ecuația de mai sus poate fi rescrisă astfel:

$$\Phi(x, y, z) = \frac{\Phi_0}{r_0^2} (r^2 - 2z^2) \quad (1.18)$$

Ecuațiile de mișcare pentru un ion sunt:

$$\frac{d^2 z}{dt^2} - \frac{4e}{m_i r_0^2} (U - V \cos \omega t) z = 0 \quad (1.19)$$

$$\frac{d^2 r}{dt^2} + \frac{2e}{m_i r_0^2} (U - V \cos \omega t) r = 0 \quad (1.20)$$

Rezolvarea acestor ecuații diferențiale, care sunt de asemenea de tip Mathieu, conduce la obținerea parametrilor  $a_z$  și  $q_z$  de forma:

$$a_z = -2a_r = -\frac{16eU}{m_i r_0^2 \omega^2}, \quad q_z = -2q_r = -\frac{8eU}{m_i r_0^2 \omega^2}, \quad (1.21)$$

unde  $\omega = 2\pi f$ ,  $f$  fiind frecvența fundamentală a trapei de ioni.

Cu ajutorul trapei de ioni se pot realiza ușor experimente MS/MS și ciocniri (MS)<sup>n</sup> [1]. Rezoluția este de  $10^6$  iar sensibilitatea este foarte ridicată.

## 1.5. Tipuri de detectori

Un detector ideal ar trebui să conțină următoarele exigențe:

- să asigure o corespondență perfectă între numărul de ioni incidenți și impulsurile de ieșire;
- impulsurile de ieșire să fie de o amplitudine suficient de mare în comparație cu toate impulsurile de zgomot;
- să existe o posibilitate de discriminare între ionii având același raport masă la sarcină dar având diferite stări de încărcare electrică;
- să fie posibilă discriminarea între ionii atomici și cei moleculari având același raport de masă la sarcină;
- să existe posibilitatea de control simultan a cel puțin două mase;
- să dea un răspuns liniar pe mai multe ordine de mărime în intensitate.

Toate aceste cerințe nu pot fi satisfăcute simultan. Ionii separați de analizorul de masă trebuie înregistrați cu ajutorul unui detector corespunzător. Funcția de detector poate fi îndeplinită de diferite dispozitive. Cele mai frecvent utilizate sunt:

- **Multiplicatori de electroni secundari** (SEM: secondary electron multiplier): construcția lui este similară cu tuburile fotomultiplicatoare. Constă dintr-o serie de diode prepolarizate care emit electroni secundari când sunt lovite de un ion, multiplicând astfel curentul ionic care poate fi prelucrat analogic sau digital [4].
- **Chaneltronul**: are o structură dinodică continuă de forma unui tub cu interiorul acoperit cu un material ce este capabil să emită electroni. Când ionul se ciocnește de pereții channeltronului, acesta emite electroni secundari care prin efect de cascadă creează electroni secundari adiționali care printr-un efect de cascadă creează electroni secundari adiționali, finalizând într-un puls de curent [4].
- **Cușca Faraday**: constă dintr-o cupă metalică plasată în drumul fasciculului de ioni. Este legată de un electrometru care măsoară curentul ionic. Cușca Faraday este mai puțin sensibilă ca ceilalți detectori.
- **Placa cu microcanale**: constă dintr-o serie de capilare de sticlă cu diametru interior de 15–20  $\mu\text{m}$ , care în interior sunt acoperite cu un material capabil să emită electroni.

Capilarele sunt conectate la un potențial mare. Funcționarea lui este asemănătoare cu cea a chaneltronului, efectul de cascadă producând o amplificare de  $10^3$ – $10^4$  [4].

- **Sensibilitatea:** spectrometrului de masă este funcție de numărul de ioni ce lovesc detectorul față de cantitatea substanței introduse în sursa de ioni și factorul de amplificare al detectorului (C/mg). La rezoluție joasă, doar un ion ajunge la detector din  $10^3$  molecule introduse în sursa de ioni. Pentru specificarea sensibilității în termeni de curent ionic pentru o cantitate dată de probă, se folosește stearatul de metil.

## 1.6. Înregistrarea și achiziția datelor MS. Modul de lucru

*Spectrul de masă* este înregistrarea abundenței ionilor unui compus în funcție de raportul masă/sarcină ( $m/z$ ), caracterizând substanța, fiind specific acesteia. Putem spune că spectrul de masă este o „amprentă” a substanței, spectrometrul de masă fiind un detector ideal pentru componenții separați prin cromatografie de gaze. Spectrul de masă se utilizează pentru identificarea unui compus necunoscut, prin compararea spectrului de masă necunoscut cu cel al unor compuși cunoscuți, pentru determinarea structurală a acestuia.

Pentru obținerea de informații precise asupra structurii și tăriei legăturilor compusului de analizat prin studiul căilor de fragmentare ale compusului, poate fi utilizată tehnica de măsură a maselor exacte în înaltă rezoluție, tehnica măsurării ionilor metastabili.

*Baleiajul masei.* În cazul spectrometrelor de masă cu analizor magnetic, baleind câmpul magnetic obținem spectrul de masă. Baleiajul e controlat de calculator care optimizează condițiile din sursa de ioni. Filtrul analog preia semnalele de la SEM care se trec apoi la convertorul analog digital (ADC). Viteza de lucru selectată conduce la un număr de date punctiforme de-a lungul fiecărui ion semnal pentru obținerea picului și determinarea poziției și intensității lui. Viteza de baleiaj și rezoluția conduc la viteza de digitalizare aleasă. Instrumente cu baleiaj rapid folosesc o viteză de conversie de până la 250 kHz. Între MS și calculator se găsește ADC și alte dispozitive de operare.

*Modul de lucru cu ioni selectați (SIM)* În modul de lucru SIM masele ionilor individuali sunt selectați continuu sau în secvență, pentru măsurarea mai multor ioni. În acest mod de lucru sensibilitatea crește mult față de un baleiaj în care ionii sunt înregistrați timp de 0,05 - 1ms.

La instrumentele magnetice fiecare ion este selectat pe rând prin alegerea tensiunii de accelerare corespunzătoare la câmp magnetic constant. Comutarea ionilor se poate face rapid dar domeniul de masă este limitat. Instrumentele cuadrupolare sunt potrivite în mod particular modului de lucru SIM întrucât tensiunile barelor pentru transmiterea ionilor selectați pot fi schimbate cu acuratețe și rapid [4].

## 1.7. Prelucrarea datelor MS

În cazul prelucrării datelor de achiziție se identifică mai întâi masa de calibrare. În computer sunt prelucrate masele de referință, prin baleiajul unui compus de calibrare util pentru stabilirea valorilor maselor ionilor probei. În cazul spectrometrelor de masă cuadrupolare, computerul realizează focalizarea de rutină a instrumentului utilizând substanța de referință astfel ca intensitățile ionilor selectați să fie în anumite limite. Ionii compușilor de referință trebuie să nu interfere cu ionii probei. Grafic, spectrul de masă se obține prin reprezentarea pe abscisă a raportului  $m/z$  și pe ordonată a abundenței relative a ionilor față de cel mai intens ion al spectrului care se ia 100%. Ionul cel mai intens din spectru se numește *ion de bază*. Această procedură se numește *normarea spectrului*. Există programe care reprezintă spectrul de masă și marchează automat ionii cei mai intensi.

*Scăderea spectrului.* Există posibilitatea de a îndepărta ionii din fondul spectrometrolui sau ionii unui component nedorit, prin diminuarea numărului ionilor de interferență din spectrul compus. Programul se utilizează și în cazul îndepărtării unor componenți parțial rezolvați din spectrul de masă.

*Date de așezare pe ioni selectați.* Din datele SIM, pentru determinarea cantitativă sensibilă a unor componenți, se selectează mase specifice reprezentând cromatograme prin trasarea fiecărui ion în funcție de timp. În modul de lucru SIM sensibilitatea crește de aproximativ  $10^3$  ori.

*Biblioteca de spectre* este folosită pentru identificarea componenților prin comparația spectrului compusului necunoscut cu spectre de masă a unor componenți cunoscuți.

Diferite procedee de laborator, cum ar fi măsurătorile metastabile, incorporarea de izotopi stabili, utilizarea unor derivatizări, metode de ionizare alternative, MS/MS etc., conduc la identificarea unui component necunoscut. Acesta poate fi determinat prin măsurători de masă exactă [4].

## 1.8. Aplicații medicale ale spectrometriei de masă

Diagnosticarea bolilor care presupun anomalii de ordin biochimic necesită adesea analiza cantitativă a unor molecule cu masă moleculară mică, metaboliți, peptide, proteine sau hormoni din plasmă, urină sau alte fluide biologice [5].

*Biomarkerii* sunt substanțe folosite ca indicatori ai unei stări biologice. Cu ajutorul lor, se pot diagnostica anumite boli și se poate interpreta eficacitatea tratamentului.



Determinarea biomarkerilor nu este deloc o sarcină ușoară din cauza complexității sistemelor biologice. În primul rând, există *variația biologică normală* de 10–40% care rezultă din fondul genetic, mediu, dietă, vârstă, sex și alte posibile variable [6, 7]. Testele ce implică determinarea colesterolului, a glucozei din sânge, a trigliceridelor etc. presupun un domeniu considerat normal și nu doar o singură valoare normală. La fel se întâmplă și în cazul biomarkerilor. Prin urmare este necesară analiza statistică pentru determinarea domeniilor de concentrații normale și anormale pentru fiecare biomarker. Sistemele biologice sunt alcătuite dintr-un număr enorm de biomolecule extrem de diverse. Aceste molecule pot fi compuși organici sau anorganici simpli, precum glucoza sau  $\text{Na}^+$ , dar și biopolimeri complecși precum: lipide, proteine și carbohidrați.

În analiza sistemelor biologice, există o serie de reguli care trebuie luate în considerare [8]:

1. Toate probele trebuie să fie tratate la fel (dezvoltarea unui protocol pentru procesele de colectare, stocare și utilizare).
2. Timpul este „inamicul” experimentului (cu cât probele sunt stocate mai mult timp în condiții mai puțin optime, cu atât se vor produce mai multe artefacte).

Descoperirea biomarkerilor este atribuită științelor marcate prin sufixul „-omică”. Studiile legate de diabet, obezitate, alergii și imunitate, nutriție – sunt câteva exemple în care științele „-omice” (transcriptomica, proteomica, metabonomica) au condus la descoperiri remarcabile.

Spectrometria de masă este o tehnică analitică deosebit de importantă în laboratoarele medicale, permițând un domeniu vast de diagnosticări. În numeroase aplicații, MS necesită cuplajul cu cromatografia datorită avantajului acesteia din urmă de a realiza separarea optimă a metaboliților.

În zilele noastre, laboratoarele moderne dispun, în funcție de posibilitățile financiare, de aparate-hibrid precum: GC-MS, HPLC-MS, LC-MS sau ESI MS/MS.

În cele ce urmează, voi prezenta prin câteva exemple rolul acestor tehnici hibrid în descoperirea biomarkerilor care au legătură cu:

## **Obezitatea și diabetul**

Obezitatea este o boală complexă ce implică factori genetici, de mediu și de comportament, fiind, în general, ereditară. În Europa și America de Nord, obezitatea reprezintă cea mai des întâlnită tulburare nutrițională. Transcriptomica a investigat impactul pe care îl au cantitatea de grăsime din dietă, restricțiile alimentare și proteinele din soia asupra expresiei genelor [5].

Obezitatea cauzează adesea rezistența la insulină (insulina nu mai controlează nivelul de glucoză din corp).

În urma unui studiu realizat prin GC-MS, Zeng et al. (2011) au propus ca biomarkeri pentru diabetul de tip 2, următorii zece metaboliți, corelând nivelul acestora din sânge cu nivelul de glucoză [9]: acidul lactic, alanina, acidul  $\alpha$ -hidroxi-izobutiric, fosfatul, serina, acidul piroglutamic, acidul palmitic, acidul stearic, 1-monopalmitina și colesterolul.

## **Alergiile**

Alergenii pot fi clasificați în funcție de căile de interacțiune cu organismul gazdă: alergenii aerieni invadează sistemul respirator, cei alimentari sunt preluați prin tractul gastrointestinal iar alergenii de contact pătrund prin piele [8]. Mai bine de 20 de markeri genetici care au fost asociați alergiilor sunt mai degrabă indicatori ai procesului inflamator decât ai alergiei.

Câțiva dintre cei mai importanți alergeni sunt cei proveniți din alimente de origine animală sau vegetală. Spectrometria de masă MALDI-ToF a fost intens utilizată în descoperirea și caracterizarea alergenilor.

## **Boala Alzheimer**

Boala Alzheimer este o tulburare neurodegenerativă a sistemului nervos central, incurabilă până la ora actuală, caracterizată prin pierderea progresivă a memoriei de scurtă durată și a funcțiilor cognitive [10].

Sato et al. (2011) au analizat prin LC-MS/SIM desmosterol (un precursor al colesterolului) din plasma persoanelor sănătoase și bolnave de Alzheimer [11]. Rezultatele lor au arătat faptul că nivelul de desmosterol și raportul desmosterol/colesterol este mult mai mic la persoanele care aveau Alzheimer. Autorii au sugerat faptul că desmosterolul poate fi un potențial biomarker al bolii Alzheimer.



# Capitolul II

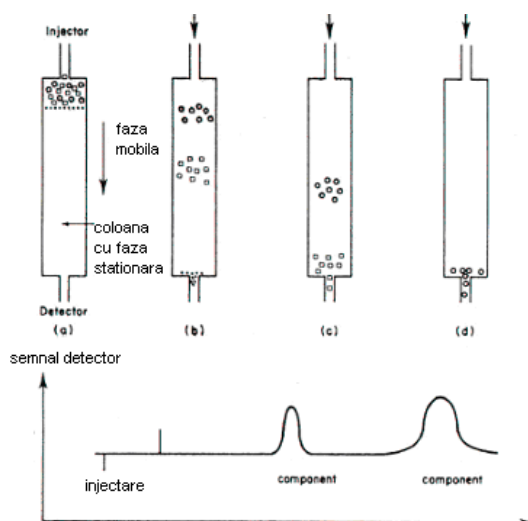
## Cromatografia de gaze

### 2.1. Principiul de bază al cromatografiei de gaze

Cromatografia este o metodă de separare a amestecurilor multicomponente. Ea se bazează pe repartiția diferită a componentelor unui amestec într-o fază mobilă și una staționară (nemiscibilă), având ca urmare deplasarea cu viteză diferită a componentelor purtați de faza mobilă de-a lungul fazei staționare. Cele două faze sunt o fază staționară imobilă cu o suprafață mare și una mobilă care curge într-o direcție și poate fi gazoasă sau lichidă.

Cromatografia de gaze este un tip comun de cromatografie folosită pentru separarea și analiza compușilor volatili și semivolatili. În unele situații, cromatografia de gaze poate fi de ajutor în identificarea unui compus [12].

În cromatografia de gaze, faza în mișcare (sau „faza mobilă”) este gazoasă, de obicei un gaz inert precum heliul sau un gaz nereactiv asemenea azotului, iar faza staționară poate fi lichidă sau solidă. Separarea este realizată prin diferențele în distribuția componentelor individuali ai probei între faza mobilă și staționară, cauzând mișcarea componentelor prin coloană cu diferite viteze.



**Fig. 2.1.** Schema unui cromatograf de gaze care demonstrează separarea substanțelor pe o coloană.

Cromatografia de gaze este de asemenea similară cu distilarea fracționată, întrucât ambele procese separă componenții unui amestec care se bazează în primul rând pe diferențele dintre punctele de fierbere (sau presiunea vaporilor). Totuși, distilarea fracționată este de obicei folosită pentru a separa componenții unui amestec pe o scară mare, în timp ce cromatografia de gaze poate fi folosită pe o scară mult mai mică.

Secvențele operațiilor în analiza cromatografică:

- proba este injectată în injector unde este evaporată și introdusă în coloana cromatografică
1. analiții vor călătorii cu faza mobilă
  2. analiții interacționează cu faza staționară, sunt întârziați individual și sunt separați

Cerințele pentru ca un analit să fie supus analizei cromatografice sunt ca transferul de masă să aibă loc în stare gazoasă, ceea ce cere ca analitul să fie în faza gazoasă sau de vapori fără a se descompune (trebuie să fie stabil termic până la 300 °C), sau trebuie să fie un compus nevolatil care să fie transformat în derivați volatili prin reacție chimică sau trebuie să fie o substanță care poate fi supusă descompunerii controlate.

Avantajele cromatografiei de gaze sunt:

1. viteza analizei
2. eficiența separării
3. sensibilitatea
4. automatizarea

Un sistem cromatografic de gaze este alcătuit dintr-un sistem injector încălzit conectat la o coloană montată într-un cuptor cu temperatură controlabilă. Un gaz purtător este trecut de la nivelul injectorului prin coloană în detector. O cantitate mică din amestecul ce trebuie analizat este introdus în curentul de gaz prin injectare cu o seringă în septul injectorului. Diferenții componenți ai amestecului trec prin coloană la momente diferite, unele fiind reținute perioade mai lungi de timp decât altele, ajungând astfel la detector pe rând.

Există mai multe tipuri de cromatografie, în funcție de tehnică, modul de lucru și proprietățile fizico-chimice ale fazelor. Cea mai importantă clasificare este după starea de agregare a fazei mobile, în cromatografie în fază gazoasă și cromatografie în fază lichidă. Tehnica de lucru diferă atât de mult în aceste două grupe încât se lucrează în două direcții distincte cu o aparatură și literatură de specialitate proprie.

În funcție de modul de lucru există mai multe variante: cromatografie prin eluare, prin dezlocuire, frontală. În primul caz se injectează o anumită cantitate de probă în curentul fazei mobile (eluent), care o poartă de-a lungul fazei staționare. Dacă eluentului

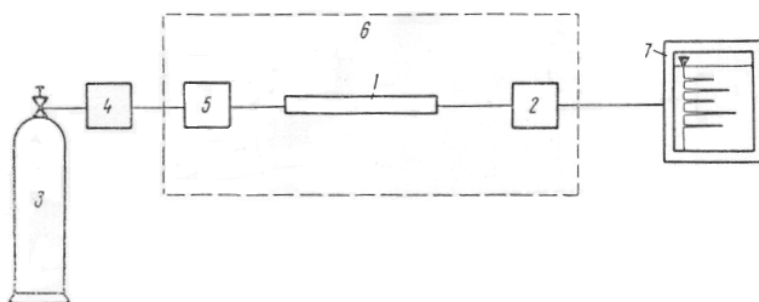
i se adaugă substanța care interacționează mai puternic cu faza staționară decât componentii probei, atunci aceștia sunt dezlocuiți treptat, realizându-se cromatografia prin dezlocuire.

## 2.2. Modelul teoretic al cromatografiei de gaze

Un model teoretic al cromatografiei în fază gazoasă constă dintr-un număr mare de rezervoare care conțin fiecare lichid nevolatil. Peste lichid trece un curent de gaz în care este injectată proba de studiat. Faza gazoasă se va dizolva în lichid. Cantitatea dizolvată depinde de natura probei și a lichidului, de presiunile parțiale ale fiecărui component din probă și de temperatura sistemului [1].

Presiunea parțială a fiecărui component variază pe măsură ce proba înaintează în coloana cromatografică. Componentii dizolvați vor reintra în curentul de gaz, când presiunile lor parțiale de deasupra fazei lichide vor scădea. În lungul coloanei, componentii probei se vor deplasa cu viteze diferite, mai mici decât ale gazului purtător (eluent), prezentând timpi de retenție diferiți.

Schema de principiu a unui cromatograf de gaze este reprezentată în fig. 2.2. Elementele principale sunt: coloana 1 și detectorul 2. La acestea se mai adaugă următoarele anexe: o sursă de eluent 3, un dispozitiv de măsurare și reglare a debitului 4, un dispozitiv de introducere a probei 5, un termostat 6 și un instrument de înregistrare 7 a semnalelor înregistrate de detectori.



**Fig. 2.2.** Schema de principiu a unui cromatograf de gaze.

Gazul inert trece prin partea inferioară a septului injectorului care este încălzit independent de restul sistemului la o temperatură superioară față de cea a coloanei pentru a preveni condensarea probei. Injectorul este legat de capătul coloanei, astfel gazul preia proba și o transportă direct în coloana cromatografică, care este încălzită la o temperatură foarte bine controlată ce poate fi constantă sau variată folosind un anumit program de temperatură, care este ales în funcție de analizi. Temperatura înaltă dă un timp de

retenție mai scurt pentru un anumit component al probei. Din cauza interacțiunii moleculelor probei cu faza staționară, componenții rămân în urma eluentului. În funcție de diferențele care există între echilibrele lor de repartiție între cele două faze, se produce o diferențiere a vitezelor lor de migrare și separare. Eșalonați astfel în timp, componenții sunt purtați de eluent, după ieșirea din coloană, în detector.

Reprezentarea grafică a semnalului detectorului în funcție de timp, se numește cromatogramă.

Semnalele obținute sub forma unor vârfuri, numite picuri, corespund componenților probei. Timpul la care apare maximul unui pic, măsurat din momentul introducerii probei, se numește timp de retenție,  $t_R$ , mărime ce caracterizează, din punct de vedere calitativ, un component  $i$  al amestecului analizat. Acesta se compune din timpul  $t_M$  în care eluentul și componentele care nu interacționează cu faza staționară parcurg distanța până la detector și din întârzierea provocată de interacțiunea componenților cu faza staționară. Această întârziere se numește timp de retenție ajustat,  $t'_R$ :

$$t'_R = t_R - t_M \quad (2.1)$$

Toate mărimile utilizate pentru identificarea componenților separați derivă din timpul de retenție și se numesc parametri de reținere. Timpul de reținere este dependent de temperatura și condițiile de lucru, astfel nu poate fi utilizat ca atare pentru caracterizarea unui component. El trebuie să fie corectat și transformat într-un parametru independent de aparat, fie raportat la timpul de reținere al unei substanțe de referință, separată concomitent cu componentul respectiv în același cromatograf și în aceleași condiții.

Orice sistem gaz cromatografic constă din următoarele componente: un sistem de introducere a gazului purtător, un sistem de injectare a probei de analizat, o coloană pentru separarea componenților, un detector pentru a măsura cantitatea de componenți separați și un sistem de date.

**Gazul purtător.** Gazul purtător trebuie să fie nereactiv, cele mai utilizate fiind azotul, heliul, hidrogenul. Hidrogenul trebuie să fie uscat și purificat. Heliul este perfect deoarece este inert chimic, dar este costisitor. Neonul, similar heliului, are vâscozitate mare, care conduce la gradient de presiune mare de-a lungul coloanei. Azotul este ieftin, existând metode de purificare convenabile.

**Coloana.** Coloanele se împart în coloane cu umplutură și coloane tubulare deschise capilare. Se utilizează oțel sau sticlă (cuarț). Coloanele cu umplutură au diametre de 2–8 mm și lungimi de până la 20 m, în timp ce coloanele capilare au diametre mai mici de 1 mm și lungimi de până la 200 sau 300m.

Faza staționară se alege chimic similară cu componenții de separat. Coloanele capilare nu conțin suport, faza lichidă este dispusă pe pereții coloanei. Avantajul acestei

metode este că presiunea asupra coloanei este mică. Dezavantajul este acela că faza staționară este mică comparativ cu faza mobilă și este posibilă supraîncărcarea coloanei.

**Detector.** Ca și alte tehnici analitice, succesele cromatografiei de gaze depind de eficiența sistemului de detecție. Primii detectori utilizați în cromatografia de gaze s-au bazat pe proprietăți termice ale fazei gazoase. Cerințele pentru un detector sunt sensibilitatea ridicată (raport semnal ieșire/semnal intrare), limita de detecție bună și liniaritate în domeniul de operare (răspuns liniar între semnalul măsurat și concentrația injectată). La ieșirea din coloană compușii interacționează cu detectorul. Detectorul convertește această interacțiune într-un semnal electric care este trimis sistemului de date. Mărimea semnalului se înregistrează în funcție de timp (de la momentul injectării) și apare cromatograma.

Unii detectori răspund la orice soluție care eluează prin coloană, alții răspund doar la soluții cu structură, grupe funcționale sau atomi specifici. Primii sunt detectori universali, ultimii detectori selectivi, care dau răspuns specific diferitelor tipuri de componente.

Detectorii au rolul de a sesiza continuu, rapid și cu mare sensibilitate apariția fiecărui component din proba de analizat, transformând această modificare într-un semnal electric, care apoi este amplificat și înregistrat. Este necesar ca un detector să aibă sensibilitate ridicată, o bună selectivitate, un răspuns rapid, liniaritate și zgomot de fond redus.

Un detector specific utilizat în cromatografia de gaze pentru floro cloro carbonați este detectorul cu captură de electroni, iar unul din cele mai utilizate tipuri de detectori este cel cu ionizare în flacără.

Un detector specific este și spectrometrul de masă, cuplat după coloana cromatografică, astfel fiind posibilă înregistrarea spectrelor de masă ale analiților. Combinația dintre cromatograful de gaze și spectrometrul de masă a produs un instrument ce prezintă o importanță considerabilă în domeniul analitic și a cărui capabilități le depășesc pe cele ale aparatelor folosite separat, independent unul de altul [1].

### 2.3. Tipuri de detectori utilizați în cromatografia de gaze

După ce au fost separați, analiții trebuie detectați pentru a fi determinați calitativ și cantitativ. Detectorii se aleg în funcție de procedeul cromatografic utilizat, iar rolul lor este acela de a transmite semnalele electrice către înregistrator [13]. Aceste semnale sunt proporționale cu concentrațiile analiților separați sau cu *debitul masic* al acestora. Detectorii al căror răspuns este proporțional cu debitul masic (ex. detectorul cu flacără de ionizare) distrug analiții, pe când cei al căror răspuns este proporțional cu concentrația, nu au o acțiune distructivă.



Alegerea și utilizarea detectorilor presupune o atenție deosebită acordată caracteristicilor și performanțelor lor, dintre care, cele mai importante sunt [13]:

- **Specificitatea:** presupune că detectorul dă un singur răspuns pentru un singur analit. Este caracteristică numai acelor detectori care dau un răspuns discriminant față de proprietățile fizico-chimice ale unui număr mic de analiți, cu aceleași caracteristici.

Detectorii nespecifici (sau universali) sunt sensibili numai la modificarea unei proprietăți fizice generale a fazei mobile, datorată prezenței unei substanțe care nu intră în compoziția sa.

- **Sensibilitatea:** se exprimă prin raportul dintre variația semnalului  $\Delta S$  (mV sau unități de absorbanță) și variația concentrației  $\Delta C$  sau a cantității  $\Delta Q$  a analitului:

$$S = \frac{\Delta S}{\Delta C} \text{ și } S = \frac{\Delta S}{\Delta Q}, \quad (2.2)$$

unde  $S$  este sensibilitatea detectorului. Sensibilitatea nu trebuie confundată cu limita de detecție.

- **Limita de detecție:** este cantitatea cea mai mică de substanță (analit) care dă un semnal egal cu 2–3 ori semnalul fondului (semnalul dat de faza mobilă în absența analitului).
- **Liniaritatea:** exprimă răspunsul direct proporțional al semnalului detectorului la concentrația (cantitatea) de analit, într-un interval de concentrație dat, cuprins între cantitatea minimă și maximă.
- **Timpul de răspuns:** reprezintă timpul în care detectorul răspunde la variația concentrației sau a cantității de substanță.

Liniaritatea răspuns-concentrație poate fi reprezentată grafic, obținându-se o curbă exponențială care corespunde ecuației:

$$R_t = (R_{\max} - R_0)e^{-\frac{1}{\tau}} + R_0 \quad (2.3)$$

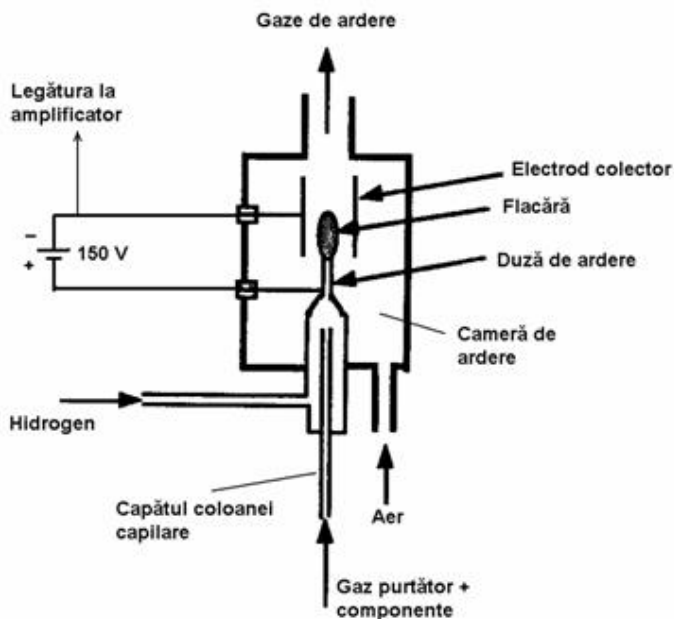
unde  $R_t$  este răspunsul semnalului,  $t$  este timpul după care apare răspunsul  $R_t$ ,  $R_0$  este răspunsul-semnal al zgomotului de fond,  $\tau$  este constanta de timp iar  $R_{\max}$  este răspunsul total ce corespunde concentrației maxime.

### 2.3.1. Detectorul cu ionizare în flacără

În cromatografia de gaze există un număr mare de detectori dintre care cel mai utilizat este detectorul cu ionizare în flacără [14, 15].

Detectorul cu ionizare în flacără folosește hidrogenul drept gaz de ardere. La ieșirea din coloană, eluentul este amestecat cu un curent de hidrogen și este aprins la capătul unei duze din platină sau oțel inoxidabil (Fig. 2.3).

Duza este montată într-o cameră de ardere ce este alimentată de un curent de aer sau oxigen. Între duză și electrodul colector așezat deasupra, se va crea, prin flacără, un câmp electric ce stabilește un curent slab ( $10^{-14}$  A) între cei doi electrozi. Intensitatea curentului va crește în momentul apariției în flacără a unui compus organic, ajungând până la  $10^{-8}$  A, în funcție de natura și de concentrația acestuia, curent care va fi mai departe amplificat și apoi înregistrat.



**Fig. 2.3.** Detectorul cu ionizare în flacără (FID – flame ionization detector)  
(sursa: <http://www.scribube.com/stiinta/chimie/Cromatografia-de-gaze41182.php>).

### 2.3.2. Detectorul termoionic

Detectorul cu ionizare termoionică reprezintă de fapt o adaptare a detectorului cu ionizare în flacără (Fig. 2.4). Acest tip de detector oferă un răspuns puternic pentru compuși organici ce conțin azot și/sau fosfor [15].

Senzorul detectorului cu ionizare termoionică este un rezistor plasat într-o pastilă de sticlă din silicat de rubidiu monovalent sau de cesiu. Căldura produsă de rezistența electrică va produce volatilizarea sărurilor alcaline. Gazul purtător este heliul care, în amestec cu hidrogenul, străbate detectorul printr-un mic jet. Dacă detectorul trebuie să răspundă

în același timp la azot și la fosfor, un debit minim de hidrogen asigură ca gazul să nu ardă. În schimb, dacă detectorul trebuie să răspundă numai la fosfor, este folosit un debit mare de hidrogen ce determină arderea amestecului de gaze. Când se aplică un potențial negativ pastilei încălzite, ea va emite electroni prin efect termoionic. Ionii de rubidiu sunt reduși la atomi neutri, iar dacă este prezentă o specie care poate accepta un electron de la atomul de rubidiu, ionizarea are loc. Ionul de rubidiu pozitiv este atras înapoi de pastila încărcată negativ. Detectorul este extrem de selectiv, nearătând răspuns pentru carbon, sulf și clor [16]. Din păcate, performanța acestui tip de detector se deteriorează cu timpul deoarece vaporii de apă generați de arderea hidrogenului transformă silicatul alcalin în hidroxid.

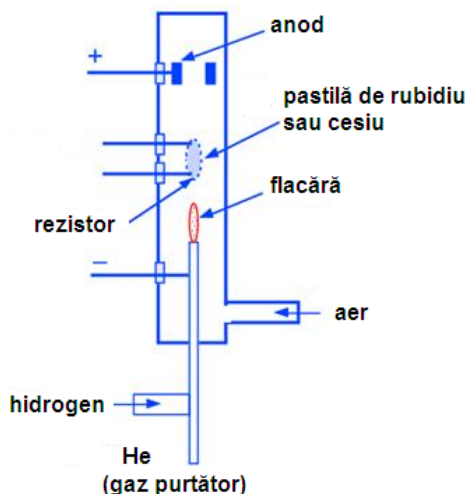


Fig. 2.4. Detectorul termoionic (sursa: <http://www.chromatography-online.org>).

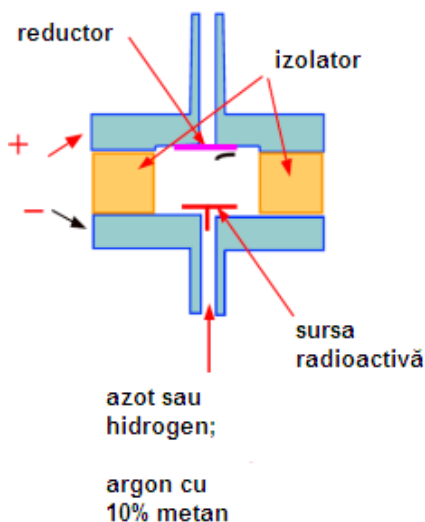
### 2.3.3. Detectorul cu captură de electroni

Detectorul cu captură de electroni conține o sursă de radiații  $\beta$  de joasă energie: tritiu sau  $\text{Ni}^{63}$  radioactiv (Fig. 2.5) [14]. Din cauza instabilității la temperaturi înalte a tritiului, sursa de  $\text{Ni}^{63}$  radioactiv este preferată în locul celei de tritiu. Acest tip de detector prezintă o mare sensibilitate pentru compușii ce pot capta electroni, precum sunt cei care conțin halogeni.

Detectorul cu captură de electroni poate funcționa în două moduri: fie aplicând o tensiune continuă, fie aplicând o tensiune pulsatorie între electrozii camerei de ionizare [15].

În modul continuu, gazul purtător poate fi hidrogenul sau azotul, care, iradiat, produce electroni și ioni pozitivi. Printr-o serie de ciocniri elastice și neelastice, fiecare electron  $\beta$  poate genera între o sută și o mie de electroni termici cu energia medie între 0.02 și 0.05 eV. Electronii liberi au o mobilitate ridicată și nu se vor recombină cu ioni

pozitivi. Electronii colectați la anod în lipsa probei constituie curentul de ionizare ce corespunde liniei de bază. Prin aplicarea unui potențial electric slab (de ordinul câtorva V), toți ionii formați în camera de iradiere sunt colectați. Prezența unei molecule cu afinitate pentru electroni va favoriza generarea de ioni negativi. Ionii negativi se recombina cu cei pozitivi iar numărul de ioni liberi și electroni scade. Prin urmare, curentul devine mai mic.



**Fig. 2.5.** Detectorul cu captură de electroni (sursa: [14]).

Operând în modul pulsatoriu, un amestec de 10% argon în metan schimbă natura mediului de captare de electroni. Electronii generați de sursa radioactivă devin electroni termici iar în absența unui potențial colector, creează un nor circular de electroni în jurul sursei. Un puls sub forma unei unde pătrate, cu perioadă scurtă (câteva microsecunde), este aplicat electrodului, colectând astfel electronii termici, cu timp suficient între pulsuri, pentru ca aceștia să umple din nou camera de ionizare și să ajungă la echilibru termic. Acesta reprezintă curentul de bază. Curentul staționar produs are o amplitudine de  $10^{-8}$  A. În perioadele când unda este inactivă, electronii termici vor avea timp suficient pentru a interacționa cu orice molecule ce captează electroni, producându-se astfel ioni negativi. Ionii negativi se vor recombina rapid cu cei pozitivi, produși simultan din interacțiunea electronilor cu particulele  $\beta$ , și astfel, curentul staționar va scădea.

Sensibilitatea acestui detector este foarte ridicată, acesta fiind probabil cel mai sensibil dintre detectorii utilizați în gaz-cromatografie [15].

## 2.4. Cuplajul cromatograf de gaze-spectrometru de masă

Primul cuplaj între cromatografia de gaze și spectrometria de masă (GC-MS) s-a realizat în anul 1957, fapt ce a permis, pentru prima dată, analiza unui amestec de compuși, fără o separare laborioasă în prealabil.

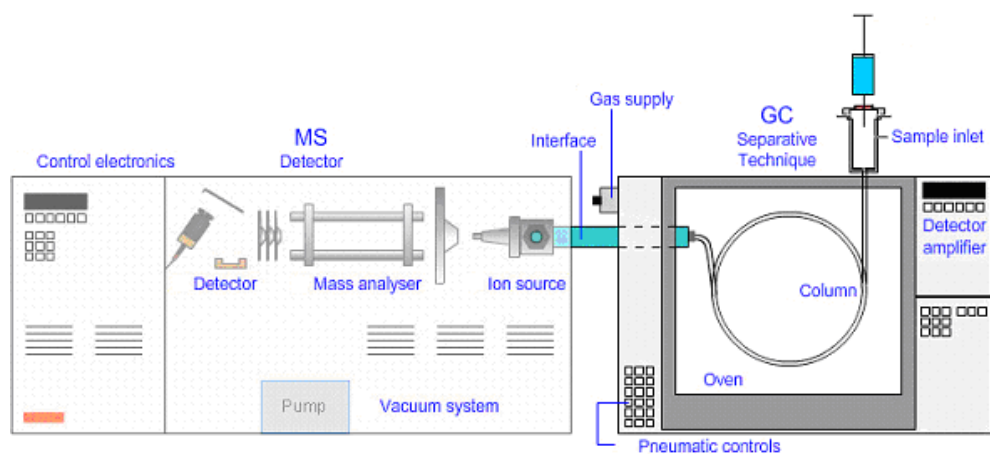
Cromatografia de gaze este una dintre metodele analitice cele mai populare, suficient de ieftină, performantă și ușor de utilizat. Amestecul de componenți ce urmează a fi analizați este injectat într-un flux de gaz inert care îl transportă printr-o coloană capilară alcătuită dintr-un suport solid, cu pereții acoperiți cu o fază lichidă. Interacțiunea de absorbție dintre componenții purtați de fluxul de gaz și stratul ce „căptușește” coloana va duce la o separare diferențiată a componenților amestecului care vor fi mai apoi purtați în ordine spre detector.

Spectrometrul de masă preia materialul injectat, îl ionizează în vid înalt, accelerează și focalizează ionii și produșii lor de fragmentare într-un analizor magnetic iar apoi îi colectează și măsoară cu ajutorul unui detector. Din punctul de vedere al identificării unui singur compus, spectrometrul de masă este instrumentul perfect însă nu este la fel de util când este vorba de un amestec de compuși.

Cuplajul celor două aparate într-un singur sistem GC-MS reprezintă un instrument capabil să separe compușii dintr-un amestec, să-i identifice și să ofere informații calitative asupra structurii chimice a fiecărui compus și informații cantitative [1].

Există numeroase posibilități de configurare a cuplajului GC-MS care au însă aceleași tipuri de componente (Fig. 2.6). Proba este introdusă în gaz-cromatograf cu ajutorul unei seringi microlitrice care străpunge un *septum* de cauciuc siliconic și ajunge în *injector*.

*Injectorul* este alcătuit dintr-un tub metalic prin care circulă eluentul și este menținut la temperatură ridicată pentru a evapora proba. Acesta conține o inserție de sticlă în care intră etanș coloana cromatografică dinspre cuptor, fixată cu un inel de grafit conic. Pentru analize complexe sau de rutină, injectarea poate fi făcută cu ajutorul unui *autosampler*, ce realizează injectări multiple, injectări de standarde și spălarea acului seringii. *Divizorul de debit*, constând dintr-o cameră de vaporizare și omogenizare, reprezintă locul în care proba este divizată iar surplusul este eliminat. Din *injector*, proba este transportată prin *coloana* cromatografică de către gazul purtător. Cu ajutorul unui program de temperatură controlat printr-un microprocesor, componenții din amestecul injectat se separă în faza staționară depusă pe pereții coloanei. Mai există un modul de *interfață*, prin care compușii separați sunt transferați în sursa de ioni a spectrometrului de masă. Spectrometrul de masă este alcătuit dintr-o sursă de ioni, lentile de focalizare, analizor de masă, detector de ioni și un sistem de pompe de vid. Un sistem de control al datelor va realiza selecția de masă, prin controlul detectorului, și un sistem va procesa datele obținute.



**Fig. 2.6.** Reprezentarea schematică a cuplajului gaz-cromatograf – spectrometru de masă (sursa: <http://www.chromacademy.com>).

În cercetarile noastre am utilizat cromatograful de gaze Trace GC cuplat cu spectrometrul de masă Thermo Finnigan GC- MS (DSQ) ( Fig. 2.7). Coloana capilară RTX- 5MS, cu faza staționară metil fenil polisiloxan, de lungime de 30 m, diametru 0, 25 mm și 0,25  $\mu\text{m}$  grosimea filmului fazei.

Cuplajul GC-MS întrunește calitățile de separare ideală prin gaz- cromatografie și de identificare ideală prin spectrometrie de masă.

Au fost elaborate metode calitative și cantitative, prin metoda GC- MS, în cadrul Laboratorului de Gaz Cromatografie si Spectrometrie de Masă, din cadrul departamentului de Fizică Biomedicală. Au fost determinați la nivel de nanograme sau picograme compuși bioactivi din plante, utili în sănătatea umană.



**Fig. 2.7.** Cuplajul GC-MS TRACE DSQ ThermoFinnigan și autosampler-ul pentru injectare automată (sursa: poza laborator GC-MS)



## Capitolul III

### Validarea metodelor de analiză

Validarea unei metode analitice este procesul prin care se stabilește, prin studii de laborator, dacă acea metodă îndeplinește condițiile pentru aplicațiile analitice pentru care a fost pusă la punct [17, 18]. Aceasta reprezintă o etapă importantă în determinarea reproductibilității și siguranței metodei. Prin validare se confirmă dacă metoda este sau nu potrivită pentru a fi utilizată.

Validarea metodelor analitice trebuie efectuată de către toate laboratoarele de analiză.

Normele IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) menționează două tipuri de validare:

- Validarea într-un singur laborator: atunci când se verifică viabilitatea metodei înaintea unui studiu în colaborare (între mai multe laboratoare). Aceasta asigură faptul că metoda pusă la punct este utilizată corect.
- Validarea completă: atunci când caracteristicile metodei au fost verificate de mai multe laboratoare, în colaborare.

#### 3.1. Criterii de validare

Principalele criterii de validare sunt cele utilizate și recunoscute de toate laboratoarele de analiză. Acestea sunt:

##### 1. Specificitatea și selectivitatea

O metodă este specifică dacă este adecvată unui singur analit în timp ce selectivitatea reprezintă capacitatea unei metode de a determina cantitativ cu acuratețe și specific analitul sau analiții, în prezența altor compuși.

IUPAC și AOAC (Asociația Științifică Dedicată Excelenței în Metode Analitice) utilizează termenul de *selectivitate* mai mult decât cel de specificitate, pentru metodele care sunt complet selective, în timp ce USP (United States Pharmacopoeia) și FDA (Food and Drug Administration) folosesc termenul de *specificitate*.

Cele mai selective metode de analiză a probelor biologice sunt cele combinate: LC-UV, LC-MS, GC-MS, GC-FT IR.

Pentru punerea la punct a unei metode de analiză, selectivitatea poate fi cercetată prin injectarea sau spotarea de etaloane.



## 2. Funcția de răspuns

Funcția de răspuns a unei proceduri analitice exprimă relația care există între răspuns (semnal) și concentrația de analit din probă. Funcția de răspuns monoton cea mai simplă care exprimă această relație se numește „curbă de calibrare”. Această funcție poate fi liniară, neexistând însă nici o obligativitate în privința aceasta. Este necesar însă ca funcția de răspuns să fie strict crescătoare sau descrescătoare pe întreg intervalul (monotonă).

## 3. Liniaritatea

Liniaritatea reprezintă capacitatea metodei de a obține rezultate direct sau indirect proporționale cu concentrația analitului din probă, într-un anumit interval de concentrații.

De obicei, liniaritatea este reprezentată printr-o dreaptă de regresie a valorii măsurate în funcție de creșterea concentrației analitului.

Criteriul de liniaritate se aplică pentru rezultatele obținute și anume pentru relația dintre concentrația calculată experimental pe baza funcției de răspuns și cea introdusă, calculată teoretic.

Funcția liniară de etalonare este dată de ecuația:

$$y = ax + b \quad (3.1)$$

unde  $a$  este panta dreptei de etalonare iar  $b$ , intersecția cu ordonata la origine.

Metoda statistică cea mai utilizată pentru a găsi cea mai bună corelare între curba de calibrare și date, este *regresia liniară* sau *metoda celor mai mici pătrate*. Pentru a măsura cea mai bună corelare a etalonului la linie, se utilizează următorii parametri: *coeficientul de corelație* și *eroarea standard a regresiei*. Coeficientul de corelație ( $r$ ) este o măsură a asocierii dintre două variabile și poate lua valori între  $-1$  și  $+1$  inclusiv, iar pentru lipsa de asociere,  $0$ . O valoare  $+1$  indică o relație liniară perfectă între semnalul analitic și concentrație, cu semnalul în creștere, iar o valoare  $-1$  indică o relație liniară perfectă cu semnalul în scădere.

## 4. Exactitatea mediei (BIAS – eroare sistematică)

Exactitatea mediei a unei proceduri analitice reprezintă îngustimea acordului dintre valoarea medie obținută într-o serie de măsurători și o valoare care este acceptată, fie ca fiind convențional adevărată, fie ca valoare de referință acceptată.

## 5. Precizia

Precizia reprezintă îngustimea acordului dintre o serie de măsurători care provin din mai multe serii ale aceleiași probe omogene, în condiții identice de lucru.

Precizia oferă date asupra erorilor întâmplătoare și nu are nici o legătură cu valoarea adevărată. Ea arată de fapt, cât de aproape sunt valorile măsurate una de alta, pentru un număr de măsurători, în aceleași condiții.

Precizia este importantă în mod particular atunci când în analiză este implicată și o etapă de pregătire a probei.

Se calculează următorii parametri care vor ajuta la aflarea domeniului în care se găsește valoarea adevărată:

- Valoarea medie.
- Variabilitatea.

Valoarea medie se calculează utilizând formula mediei aritmetice:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (3.2)$$

Variabilitatea se calculează prin aflarea deviației (abaterii) standard ( $\sigma$ ):

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad (3.3)$$

Dacă setul de date este limitat, valoarea medie este adesea aproximată ca valoare adevărată, fiind necesară estimarea abaterii standard. În acest caz, valoarea abaterii standard (notată SD – deviație standard) se calculează cu formula:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (3.4)$$

Un alt termen utilizat adesea este *coeficientul de variație* (CV) sau *deviația standard relativă* (RSD), exprimată în procente, cu ajutorul relației de mai jos:

$$RSD(\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (3.5)$$

Normele elaborate de ICH (International Conference of Harmonization), definesc precizia ca fiind formată din următoarele trei componente:

- *Repetabilitate*: rezultatele independente sunt obținute utilizând aceeași procedură, pe probe identice, în același laborator, de către același operator, cu același echipament și într-un interval scurt de timp.
- *Precizie intermediară*: rezultatele independente sunt obținute utilizând aceeași procedură, pe probe identice, în același laborator, de către diverși operatori, folosind echipamente diferite și într-un interval de timp dat.
- *Reproductibilitate*: rezultatele independente sunt obținute utilizând aceeași procedură, pe probe identice, în laboratoare diferite, de către diverși operatori și folosind echipamente diferite.

## 6. Acuratețea (exactitatea)

Acuratețea exprimă îngustimea acordului dintre rezultatul unei măsurători și o valoare de referință acceptată ca fiind adevărată, numită și „valoare adevărată”. Ea se evaluează prin aplicarea metodei de analiză studiată, la probe cu concentrații cunoscute. Probele se analizează față de soluțiile etalon corespunzătoare.

O altă variantă este aceea de a compara rezultatele obținute prin metoda nouă cu cele obținute cu o metodă deja cunoscută, despre care se știe că prezintă acuratețe.

## 7. Limita de detecție

*Limita de detecție* reprezintă cantitatea minimă dintr-un anumit component ce se poate pune în evidență, față de o probă martor, cu o anumită limită de încredere (în general 1%). În metodele cromatografice, estimarea limitei de detecție se efectuează pe baza raportului semnal/zgomot de fond (linie de bază).

Pentru estimarea limitei de detecție, în general, se consideră acceptabil un raport semnal/zgomot de 3/1 sau 2/1.

Estimarea limitei de detecție (LOD) se mai poate face și pe baza deviației standard și a pantei dreptei de regresie, utilizând formula:

$$LOD = \frac{3 \cdot \sigma}{P} \quad (3.7)$$

unde  $\sigma$  reprezintă deviația standard iar P, panta dreptei de regresie.

## 8. Limita de determinare cantitativă

*Limita de determinare cantitativă* reprezintă cantitatea minimă dintr-un anumit component identificat ce se poate *determina cantitativ*, cu certitudine.

Pentru estimarea limitei de *determinare cantitativă*, în general, se consideră acceptabil un raport semnal/zgomot de 10/1. Evaluarea raportului semnal/zgomot se realizează prin compararea semnalelor măsurate pentru probe cu o concentrație scăzută și cunoscută a analitului și a semnalelor măsurate pentru probe martor.

Valoarea estimată trebuie să fie validată prin analize independente a unui număr adecvat de probe, preparate astfel încât să conțină concentrații aproape de limita de *determinare cantitativă*.

Limita de *determinare cantitativă* (cuantificare - LOQ) se calculează utilizând formula:

$$LOQ = 3 \times LOD \quad (3.8)$$

unde LOD reprezintă *limita de detecție*.

## **9. Robustețea**

Robustețea unei metode analitice se definește prin măsurarea capacității metodei de rămâne neafectată de variații mici, deliberate, ale unor parametri.

## **10. Stabilitatea**

Stabilitatea unei metode analitice reprezintă gradul de reproductibilitate a rezultatelor obținute pe aceeași probă, în condiții diferite, precum: laboratoare diferite, analiști diferiți, aparatură diferită, diferite loturi de reactivi, zile diferite de lucru.

În studiile pe lichide biologice, trebuie cercetată stabilitatea analitului în mediul biologic precum și eventuala degradare a probei din momentul recoltării până în momentul analizei. Instabilitatea analitului este influențată de diverși factori, precum: interacțiunea cu recipientul, aerul, descompunerea termică, evaporarea componentelor volatili, fotoliză. Pentru a limita degradarea probei, se poate proceda în următoarele moduri: răcierea sau congelarea probei, păstrarea la loc ferit de lumină, adăugarea unor agenți stabilizanți, ajustarea pH-ului, derivatizarea, utilizarea unor inhibitori enzimatici. O validare completă este necesară pentru a trece de la faza de dezvoltare a unei proceduri la faza de utilizare în rutină.

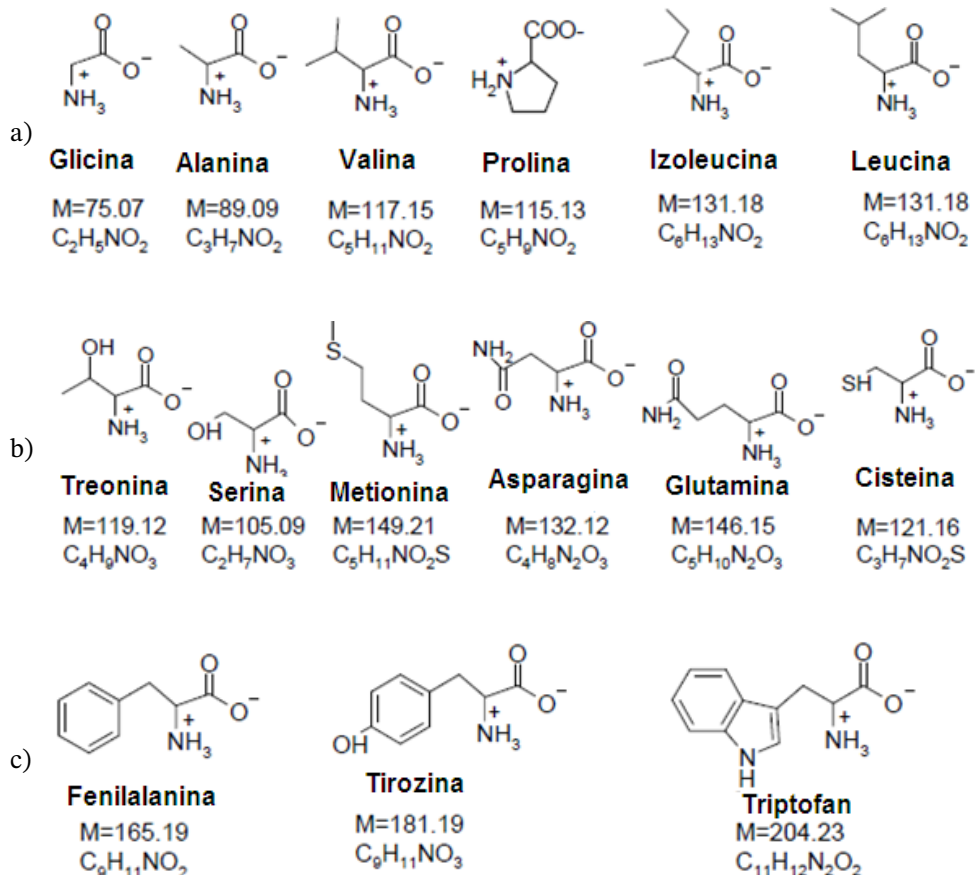


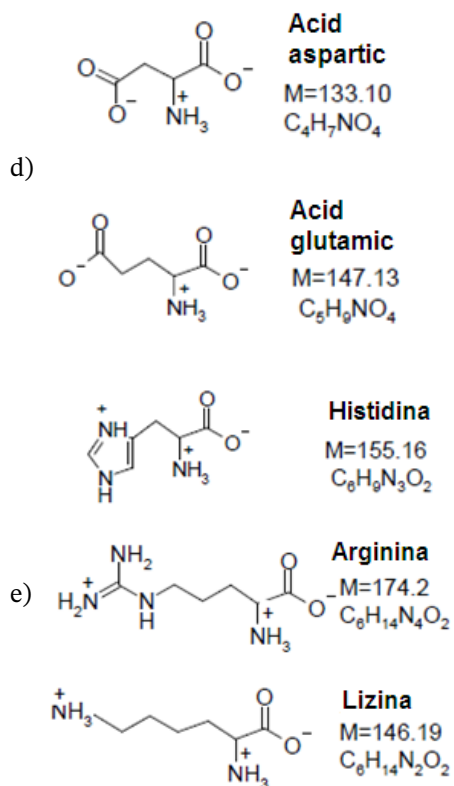
## Capitolul IV

# Analiza prin GC-MS și diluție izotopică a aminoacizilor și acizilor grași din vinuri

### 4.1. Aminoacizii

Aminoacizii sunt compuși organici care conțin în molecula lor gruparea amino ( $\text{NH}_2$ ), gruparea carboxil ( $\text{O}=\text{C}-\text{OH}$ ), gruparea CH și un radical care le conferă specificitate. Aminoacizii sunt constituenții fundamentali ai materiei vii. Prin combinarea lor se formează proteinele. În componența proteinelor intră 20 de aminoacizi, prezenți în toate organismele vii. Aceștia sunt:





**Fig. 4.1.** Structura chimică, formula și masele moleculare pentru cei 20 de aminoacizi proteinogenici (pH = 7):

- a) aminoacizi cu catena laterală nepolară;
- b) aminoacizi cu catena laterală având gruparea polară neîncărcată electric;
- c) aminoacizi cu catena laterală aromatică;
- d) aminoacizi cu catena laterală având gruparea polară încărcată electric negativ;
- e) aminoacizi cu catena laterală având gruparea polară încărcată electric pozitiv [19].

**Tabel 4.1.** Aminoacizii esențiali și ne-esențiali pentru om [20].

Aminoacizi esențiali	Aminoacizi ne-esențiali
Histidina	Arginina
Izoleucina	Asparagina <sup>a</sup>
Leucina	Acidul aspartic
Lizina	Cisteina <sup>b</sup>
Metionina	Acidul glutamic
Fenilalanina	Glutamina
Treonina	Glicina

Triptofan	Prolina
Valina	Serina
	Tirozina <sup>b</sup>
	Alanina

<sup>a</sup>-esențial pentru nou-născuți.

<sup>b</sup>-condițional-esențiali (sinteza cisteinei și a tirozinei depind de concentrația de metionină, respectiv, fenilalanină din organism).

Dintre aceștia, 9 sunt esențiali (valina, leucina, izoleucina, triptofanul, histidina, fenilalanina, metionina, lizina și treonina); ei nu pot fi secretați de organismul uman și trebuie introduși din afară, prin alimentație.

Pentru ca organismul să fie în stare să utilizeze în mod cât mai eficient proteinele, este nevoie ca toți aminoacizii să se găsească în proporții corespunzătoare. Distribuția lor cantitativă și calitativă într-o proteină determină valoarea nutritivă și funcțiile ei metabolice în organism.

Lipsa ori prezența în cantitate insuficientă a oricărui aminoacid va reduce în mod proporțional eficacitatea celorlalți.

Aminoacizii sunt folosiți în medicină la prepararea unor medicamente, în suplimente nutritive cu aminoacizi esențiali, în arome, ca antioxidanți în conserve și băuturi. Rolul lor fiziologic este deosebit. Acidul glutamic este important în dezintoxicare, glutamina e utilă în oboseală sau depresie. Glicina intervine în sinteza hemoglobinei ca precursor al glutadionului, cu acidul colic dă săruri biliare utile în digestie. Serina e precursor al cefalinei și sfingomielinei. Arginina trece în ornitină care permite sinteza spermidinei și sperminei, prolamine factori de creștere. Tirosina formează triiodotironina și tiroxin, hormoni tiroidieni, fiind importantă în eliminarea dereglajelor tiroidiene. Tirosina participă la sinteza adrenalinei și noradrenalinei, cu rol important în echilibrul psihic. Triptofanul trece în serotonină, un vasoconstrictor puternic, neurotransmițător al sistemului nervos central.

Au fost menționați în special aminoacizi care nu se găsesc întotdeauna în cantități suficiente în alimentația zilnică [21].

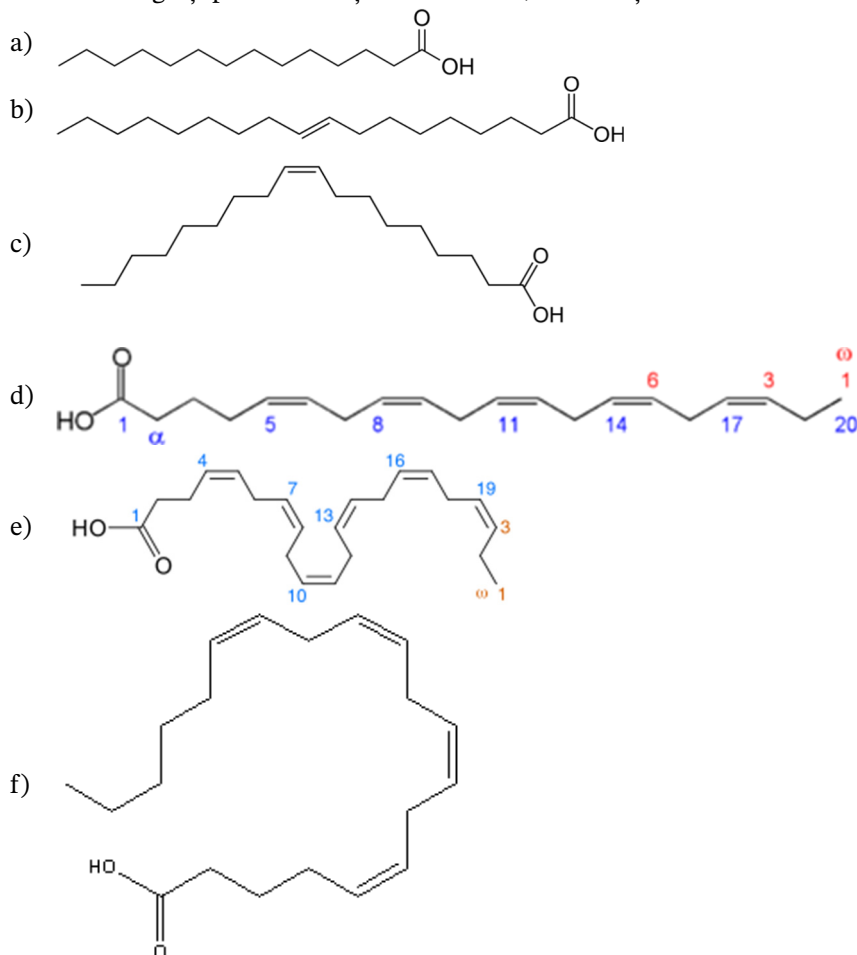
## 4.2. Acizii grași

Lumea medicală s-a confruntat cu numeroase mituri dintre care face parte și cel potrivit căruia grăsimile sunt dăunătoare. Anumite grăsimi însă, precum sunt acizii grași polinesaturați omega-6 și omega-3, joacă un rol deosebit de important în ceea ce privește sănătatea, acțiunea lor puternică fiind asemănătoare cu cea a hormonilor [21]. Aceștia sunt numiți astfel după poziția primei legături duble din lanțul de carbon. Grăsimile polinesaturate fac parte din categoria elementelor nutritive esențiale – necesare pentru



supraviețuire dar care nu pot fi sintetizate de către organism și au fost denumite *acizi grași esențiali*. La temperatura camerei, starea lor de agregare este lichidă, fapt ce justifică denumirea lor de uleiuri și nu de grăsimi.

Figura 4.2 prezintă câteva exemple de acizi grași saturați, trans, mononesaturați și polinesaturați. Spre deosebire de structura liniară și rigidă a grăsimilor saturate, structura acizilor grași polinesaturați este înclinată, răsucită și flexibilă.



**Fig. 4.2.**

- a) Acidul miristic (acid gras saturat);
- b) Acidul elaidic (acid trans nesaturat);
- c) Acidul oleic (acid gras mononesaturat din clasa omega-9);
- d) Acidul eicosapentaenoic (EPA, acid gras polinesaturat din clasa omega-3);
- e) Acidul docosahexaenoic (DHA, acid gras polinesaturat din clasa omega-3);
- f) Acidul arahidonic (acid gras polinesaturat din clasa omega-6).

Sursa: [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)

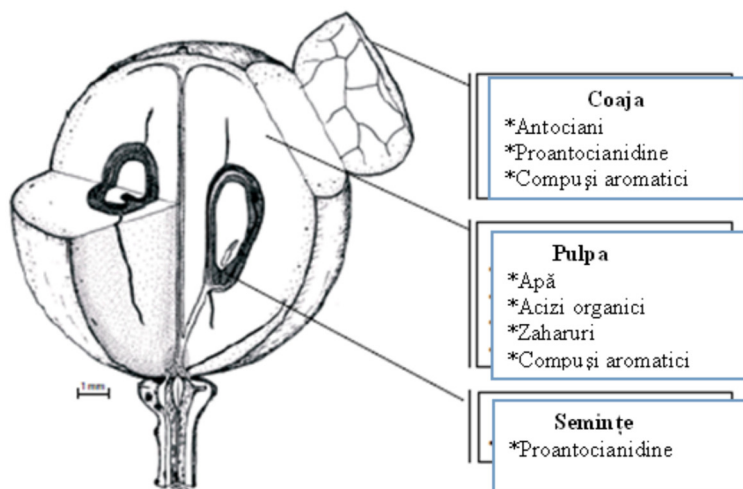
Acizii grași saturați sunt în general solizi la temperatura camerei și sunt cei mai stabili din punct de vedere chimic [21]. Surse de acizi grași saturați sunt carnea provenită de la păsări, vaci, viței, miei, porci, untura, lactatele, precum untul, smântâna, laptele, brânza, alimentele procesate, precum prăjiturile și biscuiții. De asemenea, uleiul de cocos și de palmier conțin acizi grași saturați în proporții considerabile. Utile în industria alimentară, aceste grăsimi și uleiuri pot contribui însă la apariția bolilor arteriale coronariene. Cei mai periculoși pentru sănătate sunt acizii grași *trans*, care se găsesc în margarină și în alte alimente sintetice. Acești acizi grași sunt produși chimic prin hidrogenare. Noile legături chimice sunt mai stabile decât în cazul acizilor grași saturați iar riscul apariției bolilor coronariene este mult mai mare decât în cazul grăsimilor saturate. Numeroasele dovezi științifice existente au determinat ca *American Heart Association* să aprobe folosirea acizilor grași nesaturați, atât în forma mononesaturată cât și în forma polinesaturată, considerându-i substituenți mai sănătoși ai grăsimilor saturate. Uleiurile obținute din rapiță, măsline, arahide și avocado conțin cantități mari de lipide mononesaturate. Uleiurile cu un conținut ridicat de lipide polinesaturate sunt cele derivate din uleiul de șofran, uleiul de pește, din semințele de in și de floarea soarelui etc.

Acizii grași omega-3 se găsesc în pește și în câteva plante rare, dar comestibile. Ei sunt produși numai în plante iar cele mai bogate surse de acizi grași omega-3 din oceane și ape dulci sunt algele. Surse de acizi grași omega-6 din dieta noastră sunt uleiurile vegetale și cele din semințe.

Odată consumați și absorbiți de către organism, acizii grași omega-3 și omega-6 vor trece printr-o serie de transformări biochimice desfășurate pe două căi importante. Prin prima cale, aceștia sunt încorporați în membranele celulelor. Prezența lor aici va determina creșterea fluidității membranare. Prin a doua cale, acizii grași esențiali sunt convertiți în substanțe numite *eicosanoizi* – termen ce înglobează câteva clase de molecule semnalizatoare, dintre care cele mai importante sunt *prostaglandinele*. Prostaglandinele mediază procesul inflamator – un mecanism ce luptă împotriva infecțiilor, vindecă rănilor, cu numeroase funcții în ceea ce privește sistemul imunitar, sistemul cardiovascular și la nivelul creierului, în special în regiunile care controlează dispoziția [21, 22]. În cazul ideal, acizii grași omega-6 lucrează în tandem cu acizii grași omega-3. La echilibru, derivații eicosanoizi antiinflamatori, produși de acizii grași omega-3, mențin controlul asupra derivaților eicosanoizi puternic inflamatori, produși de acizii grași omega-6. Acest lucru explică faptul că, pentru o sănătate optimă, acizii grași omega-3 și omega-6 trebuie consumați în cantități aproximativ egale (ideal, 1:1). În dieta modernă însă, cantitatea de acizi grași omega-6 este de 10 până la 20 de ori mai mare decât cea de omega-3.

### 4.3. Vinul și efectele sale benefice asupra organismului uman

Din cele mai vechi timpuri se cunosc proprietățile terapeutice ale strugurilor. Surplusul de radicali liberi din procesul de îmbătrânire e contracarat de antioxidanții, care se găsesc în semințele și pielea strugurilor împiedicând formarea acestora. Strugurii conțin vitamine, minerale, celuloză, proteine, importante pentru sănătatea omului ceea ce face ca strugurii să fie un element prețios pentru sănătate, un remediu în foarte multe boli.



Distribuția principalelor componente în struguri, importantă pentru calitatea vinului  
(Coombe B.G., 1987): Coaja, Pulpă, Semințe.

O multitudine de compuși biologic activi din struguri au proprietăți radioprotectoare, bactericide, antioxidante, neurostimulatoare, de tonifiere, proprietăți funcționale. Bioflavonoide, zaharuri, acizi, pectină, acizi organici, vitamine C, A, B1, B2, B5, B6, B9, E, PP, natriu, calciu, fosfor, magneziu, fier, zinc, cupru, siliciu și multe altele, etc. [23]

Vinul este o băutură importantă și este consumat de om de mii de ani. Obținut din struguri, vinul are o multitudine de efecte benefice datorită compoziției chimice foarte înrudită cu fructe și plante. România are o tradiție în producția viti-vinicolă, aflându-se pe locul 12 în topul producției mondiale de vin și al șaselea producător de vin din Uniunea Europeană. [24]

În România, există câteva podgorii recunoscute care oferă produse de înaltă calitate. Una dintre ele este Podgoria Târnave-Jidvei, care are patru fabrici: Jidvei, Blaj, Bălcaci și Tăuni [25]. Există diferite elemente care influențează compoziția, gustul, aroma și proprietățile vinurilor. Soiurile de struguri, originea geografică, condițiile meteorologice și factorul uman sunt cele mai importante [26]. În literatura de specialitate, pentru clasificarea și compararea vinurilor se utilizează studii bazate pe caracterizarea componentelor

(compuși fenolici, aminoacizi, compuși aromatici) [27–29]. Foarte importanți sunt și micronutrienții din alimente.

Aminoacizii joacă un rol important în nutriția umană. În multe alimente, nivelul aminoacizilor esențiali dictează valoarea lor nutritivă. Volatilele, aminoacizii, acizii grași influențează gustul vinului. Activitatea antioxidantă reflectă valoarea sănătoasă a vinului. Aminoacizii din vin au o influență considerabilă asupra calității și gustului vinului, fiind o sursă de nutrienți pentru fermentarea drojdiei [30]. Profilul aminoacizilor din vin poate fi utilizat pentru a clasifica și diferenția vinul după varietate și origine geografică [26]. Profilul volatil al vinurilor este legat de aroma, gustul și varietățile de vinuri [31]. Compoziția volatilă depinde și de originea geografică, de climă și de viticultură, fiind un indicator important pentru caracterizarea vinului [32]. Acizii grași sunt componente minore care se găsesc în vinuri, dar compoziția acizilor grași poate influența aroma și gustul vinului [28]. Compușii fenolici sunt constituenți importanți, antioxidanți naturali, găsiți în vin, cu o influență majoră asupra valorilor senzoriale, culorii și gustului [33]. Vinul este o sursă naturală de antioxidanți și se dovedește a avea beneficii importante pentru sănătate într-o dietă echilibrată [34,35].

Scopul studiului nostru a fost compararea și caracterizarea a șase vinuri albe produse în anul 2014, din struguri cultivați în Podgoria Blaj, zona Târnave, Transilvania.

#### **4.4. Obiectivul studiului**

În cadrul acestui experiment s-a urmărit compararea aminoacizii liberi și compușii volatili din șase vinuri albe din podgoria Blaj care s-au comparat și cu alte două vinuri românești, unul alb și altul roșu: Fetească Regală de Jidvei și Fetească neagră de Sâmburești. S-au dezvoltat sau adaptat metode de analiză calitativă și cantitativă a aminoacizilor și acizilor grași. Rezultatele au arătat puține diferențe între vinurile analizate. În ceea ce privesc compușii volatili, principalii compuși au fost 2-feniletanolul, monoetil esterul acidului succinic și 4-hidroxifeniletanol. Toate vinurile albe din Blaj conțin o cantitate mare de prolină în comparație cu alți aminoacizi și aminoacizi esențiali importanți. Metoda GC-MS s-a dovedit a fi o metodă excelentă pentru caracterizarea vinului.

#### **4.5. Materiale și metode**

##### **4.5.1. Reactivi și probe biologice**

Standardele de aminoacizi, anhidrida trifluoroacetică, clorura de acetil și rășina schimbătoare de ioni Dowex 50W-X8 provin de la firma Fluka (Buchs, Elveția). Glicina marcată

cu  $^{15}\text{N}$  ( $^{15}\text{N}$ -Gly, 98.98%) a fost produsă prin sinteză chimică la Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Tehnologii Izotopice și Moleculare (INCDTIM, Cluj-Napoca). Ceilalți reactivi utilizați provin de la firma Merck (Darmstadt, Germania). Vinurile albe produse în anul 2014 (Fetească Regală, Blasius, Neuburger, Traminer, Muscat Ottonel, Selenia) au fost procurate dintr-o podgorie din Blaj, Transilvania, celelalte din comerț.

#### 4.5.2. Extracția aminoacizilor și a acizilor grași din vinuri

Aminoacizii au fost extrași din 100 mL de vin. Cantitatea de vin a fost pipetată într-o coloană ( $4 \times 40$  mm), la baza căreia s-a depus întotdeauna aceeași cantitate de rășină schimbătoare de ioni Dowex 50W-8W (forma  $\text{H}^+$ ). 50  $\mu\text{g}$  de glicină marcată cu  $^{15}\text{N}$  ( $^{15}\text{N}$ -Gly) s-au adăugat în fiecare probă (100 mL), ca standard intern. Soluția colectată a fost uscată într-un curent de azot la 60 °C sau prin utilizarea unei centrifuge de vid la 60 °C. Metoda de derivatizare a inclus o esterificare a funcției carboxilice utilizând 100  $\mu\text{l}$  de butanol: clorură de acetil (4: 1 v: v), timp de o oră la 110 °C, urmată de o trifloracetilare a funcției aminice utilizând 100  $\mu\text{l}$  de anhidridă trifluoracetică timp de 20 min la 80 °C.

**Procedura de extracție pentru acizii grași:** 100 ml de vin au fost sonicate cu 0,6 ml apă/NaCl și 0,8 ml metanol timp de 1 min, apoi au fost amestecate cu 0,8 ml de cloroform și 3 min centrifugate (5800 rot/min); stratul inferior a fost colectat și extracția a fost repetată cu 0,4 ml de cloroform.

Faza inferioară de cloroform care conține acizii grași extrași a fost apoi uscată într-un curent de azot, la 60 °C. Lipidele s-au transformat corespunzător în esteri metilici ai acizilor grași prin esterificarea funcțiilor carboxilice cu 100  $\mu\text{l}$  metanol: clorură de acetil 4: 1 (v: v), 20 min, 80 °C, derivații au fost evaporați până la uscare într-un curent de azot, la 60 °C și apoi dizolvați în 500  $\mu\text{l}$  diclormetan. 10  $\mu\text{g}$  de C11: 1 a fost adăugată la fiecare probă ca standard intern pentru determinare cantitativă prin GC-MS.

**Procedura de extracție pentru volatile:** 5 ml de vin au fost amestecate 1 ml cu un solvent (amestec de acetat de etil: hexan: diclormetan, 5/1/1) timp de 2 minute și centrifugate (5800 rpm) timp de 3 minute. Supernatantul a fost colectat și 1  $\mu\text{l}$  a fost injectat în GC/MS. [36]

#### 4.5.3. Reacții de derivatizare

##### 4.5.3.1. Derivatizarea aminoacizilor

În cromatografia de gaze, analiza compușilor se realizează în fază de vapori. Un număr mare de compuși sunt însă prea puțin volatili, respectiv polari, pentru a putea fi analizați prin cromatografie de gaze. Prin anumite procedee chimice, ei pot fi modificați astfel încât să devină mai puțin polari, respectiv, mai volatili.

În cazul compușilor cu funcțiuni mixte, precum sunt și aminoacizii, analiza lor prin cromatografie de gaze presupune adesea derivatizări multiple. Alegerea reactivului de derivatizare se face în funcție de gruparea funcțională care trebuie derivatizată.

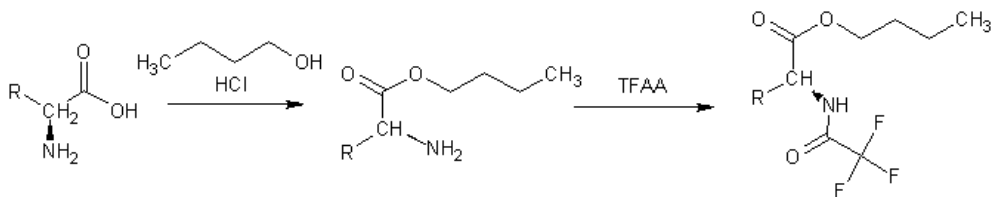
În acest experiment, pentru aminoacizi s-a realizat o dublă derivatizare. Mai întâi a avut loc o reacție de esterificare cu 100  $\mu$ L 3M HCl în butanol, timp de o oră, la 110 °C. Esterii sunt nepolari și volatili, pretându-se foarte bine analizei prin cromatografie de gaze.

După răcire și evaporare la sec în flux de azot, a urmat o reacție de trifluoroacetilare a esterilor cu 100  $\mu$ L anhidridă trifluoroacetică, timp de 20 minute, la 80 °C. Reacția de trifluoroacetilare are ca rol reducerea polarității grupării amino.

Amestecul a fost evaporat la sec, în flux de azot, la gheață. S-a adăugat acetat de etil și 1  $\mu$ L s-a injectat în gaz-cromatograf.

Se lucrează cu un exces de reactiv pentru ca reacția să fie completă. De aceea, după derivatizări, reactivul rămas trebuie îndepărtat.

Schema reacției de derivatizare a aminoacizilor este prezentată în Figura 4.3.



**Fig. 4.3.** Reacția de derivatizare a aminoacizilor.

#### 4.5.3.2. Derivatizarea acizilor grași

În cele mai multe cazuri, acizii grași sunt analizați în cromatografia de gaze sub forma esterilor lor metilici.

După extracție, probele de acizi grași au fost supuse esterificării, după evaporarea lor la sec la 60 °C, în flux de azot. Ca agent de esterificare s-a folosit 3M HCl în metanol. Reacția de esterificare a avut loc la 80 °C, timp de 20 minute. După răcire, excesul de reactiv s-a îndepărtat prin evaporarea la sec în flux de azot. Esterii metilici au fost apoi dizolvați în clorură de metilen, adăugându-se 10  $\mu$ g de C11:1 (standard intern) și au fost injectați în gaz-cromatograf.

#### 4.5.4. Aparatura experimentală

Aminoacizii și acizii grași au fost separați și identificați cu ajutorul unui cromatograf de gaze (Trace GC) cuplat cu un spectrometru de masă cu analizor cuadrupolar (Trace DSQ Thermo Finnigan) (Fig. 4.4). Separarea s-a realizat pe o coloană capilară Rtx-5MS (30 m  $\times$  0.25 mm, grosimea filmului: 0.25  $\mu$ m).



**Fig. 4.4.** GC-MS cu autosampler.

Programul de temperatură utilizat pentru separarea aminoacizilor a fost următorul: temperatura cuptorului a fost menținută la 70 °C, timp de 2 min, crescând apoi cu o viteză de 5 °C/min până la 110 °C, apoi cu 10 °C/min până la 290 °C, 16 °C/min până la 300 °C și menținută aici timp de 3 min.

Următoarele condiții de funcționare ale spectrometrului de masă au fost aceleași pentru compușii investigați: temperatura liniei de transfer: 250 °C, temperatura sursei de ioni: 250 °C, ionizarea s-a realizat prin impact electronic (energia electronilor: 70eV) iar intensitatea curentului de emisie a fost de 100 μA. Spectrometrul de masă a funcționat în modul SCAN, în domeniul de masă: 30–520 u.a.m.

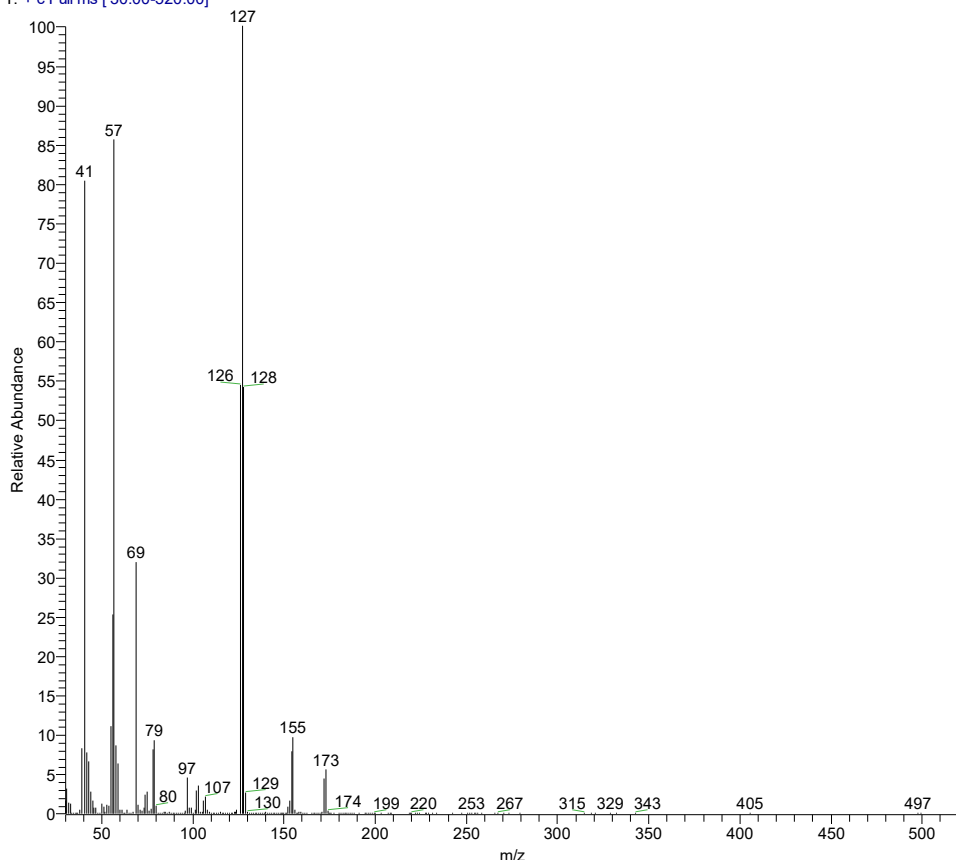
#### **4.5.5. Calculul cantitativ al aminoacizilor**

Glicina a fost determinată prin metoda diluției izotopice. S-a adăugat 50 μg de <sup>15</sup>N-Gly în fiecare probă de 100 mL de vin, înainte de extracție.

Adăugarea unui standard intern marcat izotopic, analog al aminoacidului de interes, compensează pierderile de probă care pot avea loc pe parcursul prelucrării acesteia, deoarece pierderile de standard marcat izotopic și de compus analog sunt aceleași [37].

Din compararea ariilor picului de la masa m/z 154, pentru <sup>14</sup>N-Gly (glicina naturală) și 155 pentru <sup>15</sup>N-Gly și cunoscând cantitatea de standard intern adăugată, se determină cantitatea de glicină din probe (Fig. 4.5).

AA3 #411 RT: 8.92 AV: 1 NL: 5.46E6  
T: + c Full ms [ 30.00-520.00]



**Fig. 4.5.** Spectrul de masă suprapus al  $^{14}\text{N}$ -Gly +  $^{15}\text{N}$ -Gly, sub formă derivatizată (n-trifluoroacetil N-butil ester, M = 301 și respectiv M = 302).

Fracțiile abundențelor izotopice ale glicinei și ale izotopomerului său marcat cu  $^{15}\text{N}$  au fost calculate din rapoartele izotopice determinate experimental.

Contribuțiile izotopice pot fi descrise printr-un set de ecuații liniare simultane, cu forma generală [1, 18]:

$$I_x = \sum_{i,j} A_i X_j \quad (4.1)$$

unde  $I_x$  reprezintă abundența izotopică relativă a ionului  $x$ ,  $A_i$  reprezintă contribuția fiecărei specii izotopice la fiecare masă din domeniul înregistrat, iar  $X_j$  este abundența fracțională necunoscută.

Exprimând setul de ecuații simultane în notație matricială, abundența relativă a fiecărei specii izotopice ( $A_i$ ) a fost calculată pentru cei doi ioni m/z 154 și m/z 155.

$$I = AX, \quad (4.2)$$



unde  $A$  este matricea abundenței ( $M \times N$ ) care conține contribuția fiecărei specii izotopice,  $I$  este vectorul intensităților măsurate, iar  $X$  este vectorul cantității compușilor izotopici.

Soluția setului de ecuații a fost obținută prin metoda celor mai mici pătrate astfel:

$$X = (A^T A)^{-1} A^T I \quad (4.3)$$

unde  $A^T$  este transpusa matricei  $A$  iar ridicarea la puterea -1 semnifică inversa matricei-produs ( $A^T A$ ).

Notând:

$$P := [(A^T A - 1)A^T] \quad (4.4)$$

și  $B$  matricea normată

$$Q := B \times P \quad (4.5)$$

se pot calcula în programul Excel concentrațiile glicinei din probe.

Matricea  $Q$  normalizată [1] va avea termenii:

$$X_{i,j} := 100 \cdot Q_{i,j} / Q_{i,0} \quad (4.6)$$

Concentrația probei (termenii  $Z_{i,j}$  ai matricii  $Z$ ) se obține construind matricea de termeni:

$$Y_{i,j} := Q_{i,j} / Q_{i,2} \quad (4.7)$$

(termenii  $Q_{i,2}$  reprezintă standardul intern adăugat și măsurat prin MS), și calculând termenii:

$$Z_{i,j} := Y_{i,j} \cdot Std_i / Vol_i \quad (4.8)$$

$Std_i$  și  $Vol_i$  sunt termenii unor matrici vector reprezentând cantitatea de standard intern adăugată și volumul de vin pentru care s-a făcut analiza.

Este de dorit ca matricea abundenței izotopice să fie determinată din spectre de masă; aceasta poate fi măsurată experimental pentru probe de compuși puri și standarde interne. Se utilizează spectrele normate ale speciilor izotopice și intensitățile observate pentru calculul raportului izotopic și calculul matricial.

Matricea  $A$  corectată și folosită în calculul glicinei a), precum și matricea pseudoinversă b), sunt prezentate în figura 4.6.

Pentru glicina din proba de vin, pe coloana  $[M]$  reprezentând ionul  $m/z$  154, se află contribuția naturală a izotopilor  $^{12}\text{C}$  și  $^{14}\text{N}$ : 95 atom%. Pentru glicina marcată cu  $^{15}\text{N}$ , pe coloana  $[M+1]$  reprezentând ionul  $m/z$  155, este prezentă atât contribuția  $^{15}\text{N}$ -Met (99% atomi  $^{15}\text{N}$ ) cât și contribuția izotopului  $^{13}\text{C}$ . Corecția contribuției izotopului  $^{13}\text{C}$  la  $[M+1]$  este corecția importantă care se face în programul de calcul matricial în Excel.

Gly	[M]	[M+1]	Gly	[M]	[M+1]
n.a.	0.95	0.05	n.a.	1.06	-0.06
<sup>15</sup> N	0.06	0.94	<sup>15</sup> N	-0.07	1.07
a)			b)		

**Fig. 4.6.** a) Matricea A corectată; b) Matricea pseudoinversă ( $A^{-1}$ ), unde n.a. semnifică abundența izotopică naturală, [M] și [M+1] sunt intensitățile ionilor din spectrul de masă al glicinei.

Ceilalți aminoacizi au fost calculați în funcție de cantitatea de standard intern (în cromatogramă glicina reprezintă suma dintre glicina din probă determinată prin calcul matricial și standardul intern adăugat) și ținând cont de factorii de răspuns [38] sau utilizând drepte de regresie. Folosind soluții etalon de aminoacizi, s-au determinat factorii de răspuns pentru fiecare aminoacid, care au fost necesari pentru corecția răspunsului dat de detector în cromatogramă (pentru detector spectrometru de masă, cromatograma este dată de TIC = curentul total de ioni) – cu ajutorul formulei:

$$F_i = \frac{A_i/A_j}{m_i/m_j} \quad (4.9)$$

unde  $F_i$  sunt factorii de răspuns,  $m_i$  este cantitatea corespunzătoare compusului  $i$ ,  $m_j$  este cantitatea corespunzătoare compusului  $j$  (reprezentând standardul intern) iar  $A_i$  și  $A_j$  sunt ariile compușilor  $i$  și  $j$ .

Aminoacizii din probele de vin au fost calculați cu ajutorul formulei [39]:

$$m_i(\mu\text{g}) = m_j(\mu\text{g}) \frac{A_i}{F_i \cdot A_j} \quad (4.10)$$

unde  $F_i$  sunt factorii de răspuns calculați cu ajutorul standardelor,  $m_i$  este cantitatea de corespunzătoare compusului  $i$ ,  $m_j$  este cantitatea corespunzătoare compusului  $j$  (reprezentând standardul intern) iar  $A_i$  și  $A_j$  sunt ariile compușilor  $i$  și  $j$ .

#### 4.5.6. Calculul cantitativ al acizilor grași

20  $\mu\text{g}$  de acid undecaenoic (C11:1) au fost adăugate fiecărei probe, ca standard intern, după derivatizare. Calcularea acizilor grași s-a realizat cu ajutorul următoarelor formule [40]:

$$F_i = \frac{A_i/A_j}{m_i/m_j} \quad (4.11)$$

$$C_i(\% \text{ masă}) = \frac{m_j \times A_i / F_i \times A_j}{\sum_{i=1}^n \left( \frac{A_i}{F_i} \right)} \times 100, \quad (4.12)$$

unde  $C_i$  este cantitatea de compus  $i$ ,  $F_i$  sunt factorii de răspuns calculați cu ajutorul standardelor de acizi grași,  $m_j$  este cantitatea de standard intern,  $A_i$  și  $A_j$  sunt ariile picurilor  $i$  și  $j$ ,  $F_i$  este factorul de răspuns corespunzător compusului  $i$ .

## 4.6. Rezultate și discuții

În total s-au identificat și determinat 17 aminoacizi, iar metoda a fost validată utilizând aminoacizi etalon în 0.1 N HCl. Pentru soluțiile etalon s-a aplicat aceeași metodă de derivatizare ca și pentru aminoacizii extrași din probele de vin. Precizia a fost de 20% (DSR), excepție făcând arginina, cisteina și tirozina, iar limita de detecție (LOD) a fost de 10 ng pentru fiecare aminoacid.

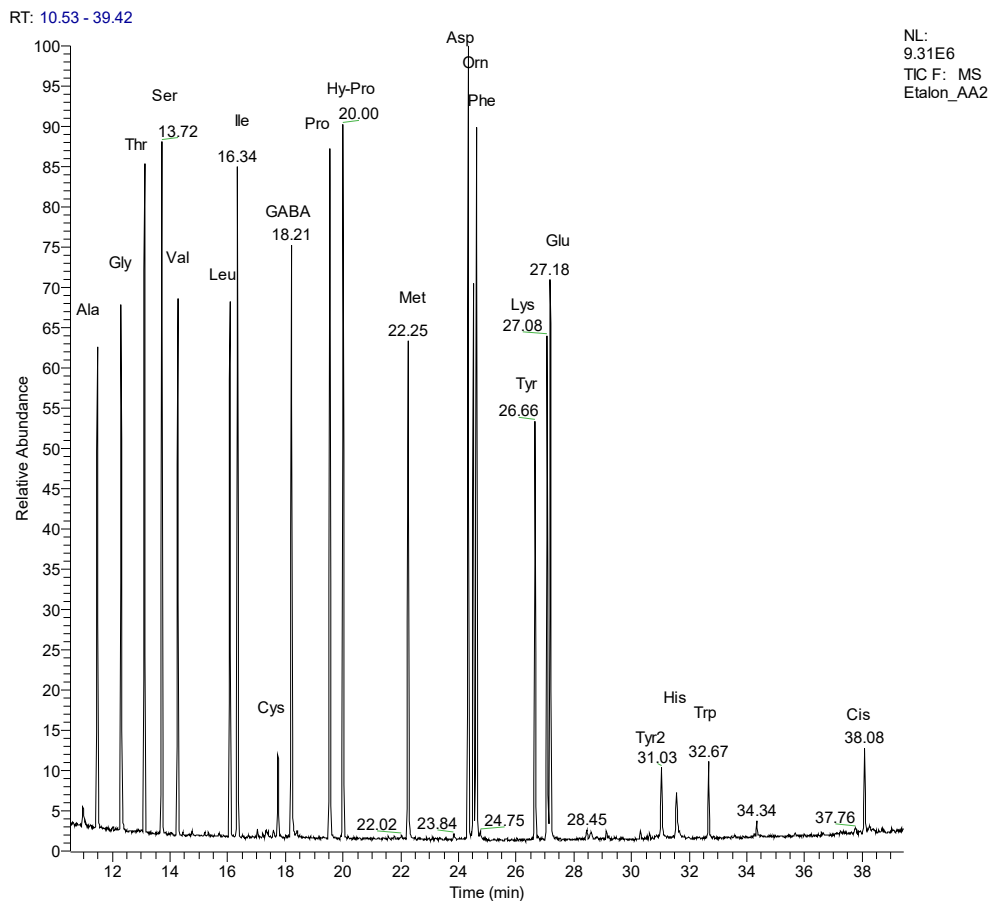


Fig. 4.7. Cromatograma unui amestec etalon de aminoacizi

Ordinea de eluție a aminoacizilor dintr-o probă de vin a fost următoarea: alanină (Ala), glicină (Gly), treonină (Thr), serină (ser), valină (Val), leucină (Leu), izoleucină (Ile), cisteină (Cys), acid  $\gamma$ -aminobutiric (GABA), prolină (Pro), metionină (Met), acid aspartic (Asp), ornitină (Orn), fenilalanină (Phe), tirozină (Tyr), lizină (Lys), acid glutamic (Glu), histidină (His) (Fig. 4.7).

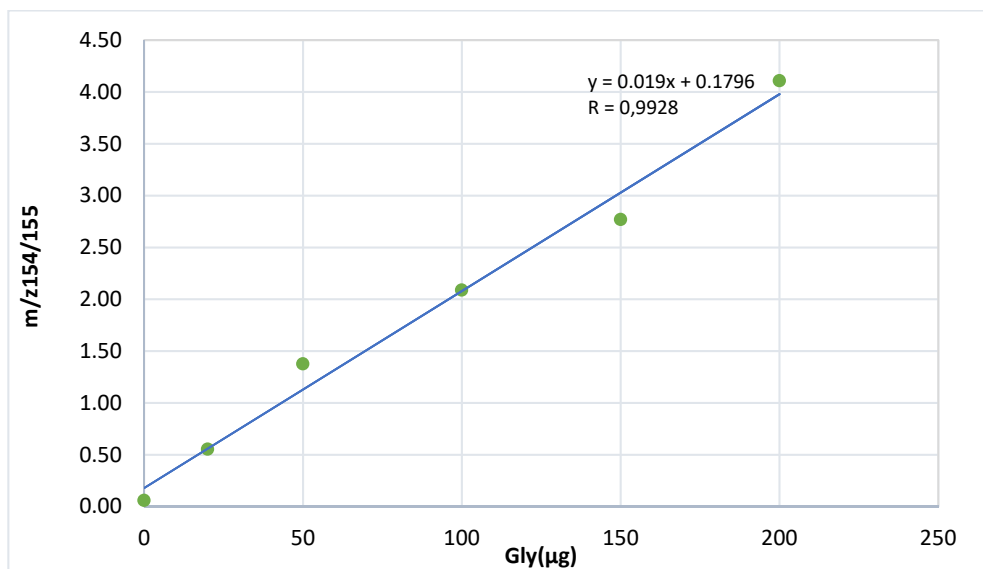
Dreptele de regresie și coeficienții de corelație ( $r$ ) pentru fiecare aminoacid studiat sunt prezentate în tabelul de mai jos. Pentru majoritatea aminoacizilor s-au obținut parametri de liniaritate buni ( $r > 0.990$ ). Limita de detecție a fost de 10 ng.

Glycina a fost determinată prin calcul matricial și cu ajutorul dreptei de regresie. Pentru stabilirea cantitativă a glicinei, au fost măsurați ionii  $m/z$  154 și  $m/z$  155 din spectrele de masă ale glicinei nemarcate, respectiv marcate cu  $^{15}\text{N}$ .

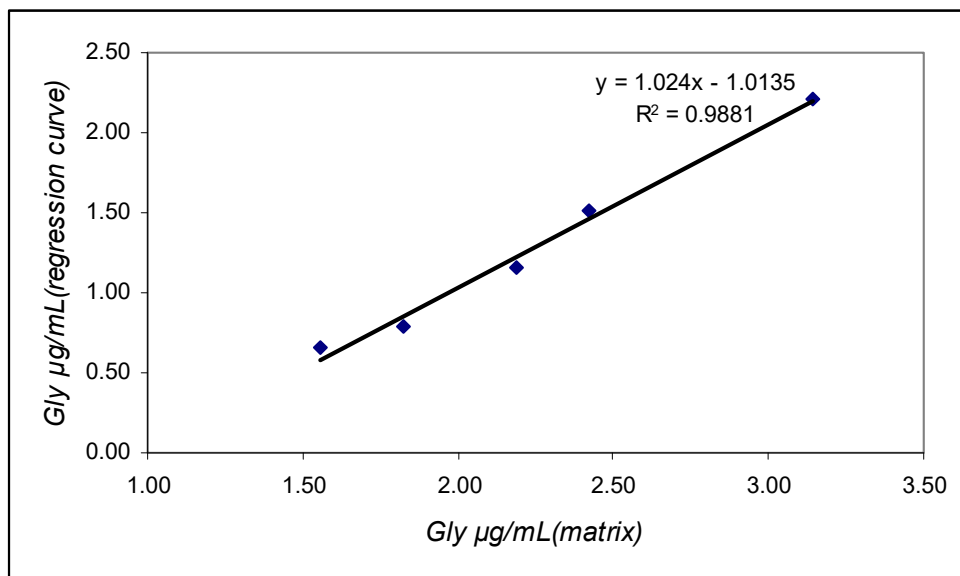
Dreapta de regresie a glicinei (Gly) s-a construit prin reprezentarea raportului ariilor ionilor  $m/z$  154 și  $m/z$  155 în funcție de cantitatea de Gly (Figura 4.8).

**Tabel 4.2.** Ecuațiile dreptelor de regresie  
și coeficienții de corelație pentru aminoacizii etalon

<b>Amino acid</b>	<b>Regression curve</b>	<b>r</b>
Alanine (Ala)	$y = 1.017x + 12.567$	0.991
Glycine (Gly)	$y = 1.0682x + 13.166$	0.996
Threonine (Thr)	$y = 1.1285x + 15.058$	0.992
Serine (Ser)	$y = 1.1041x + 12.72$	0.995
Leucine (Leu)	$y = 1.0044x + 16.09$	0.995
Isoleucine (Ile)	$y = 0.8507x + 12.37$	0.994
Valine (Val)	$y = 1.5124x - 13.434$	0.980
Cysteine (Cys)	$y = 0.1667x - 6.512$	0.940
Gama-aminobutiric acid(GABA)	$y = 2.207x - 8.8747$	0.980
Proline (Pro)	$y = 1.0331x + 20.49$	0.991
Hydroxyproline (Hy-Pro)	$y = 1.3504x - 4.257$	0.993
Ornithine (Orn)	$y = 0.7645x + 8.7581$	0.997
Phenylalanine (Phe)	$y = 0.6542x + 26.844$	0.978
Tyrosine (Tyr)	$y = 0.3209x - 5.2564$	0.973
Lysine(Lys)	$y = 1.2868x - 10.384$	0.978
Histidine (Hys)	$y = 0.6916x - 10.196$	0.957



**Fig. 4.8.** Dreapta de regresie a glicinei, obținută prin adăugarea de standard intern  $^{15}\text{N}$ -Gly unor soluții etalon, în domeniul de concentrații 5–100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



**Fig. 4.9.** Compararea celor două metode aplicate pentru calcularea glicinei cu dreapta de regresie și prin calcul matricial

Cu ajutorul bibliotecii de spectre NIST, au fost identificați următorii acizi grași: acidul palmitic (C16:0), acidul linoleic (C18:2), acidul stearic (C18:0).

Calcularea acizilor grași s-a făcut cu ajutorul formulelor (4.7) și (4.8). Tabelul 4.3 prezintă acizii grași identificați. Concentrațiile au fost exprimate în procente de masă din totalul de acizi grași.

**Tabel 4.3.** Acizii grași (%masă din totalul de acizi grași)  $T_R$  – timp de retenție;

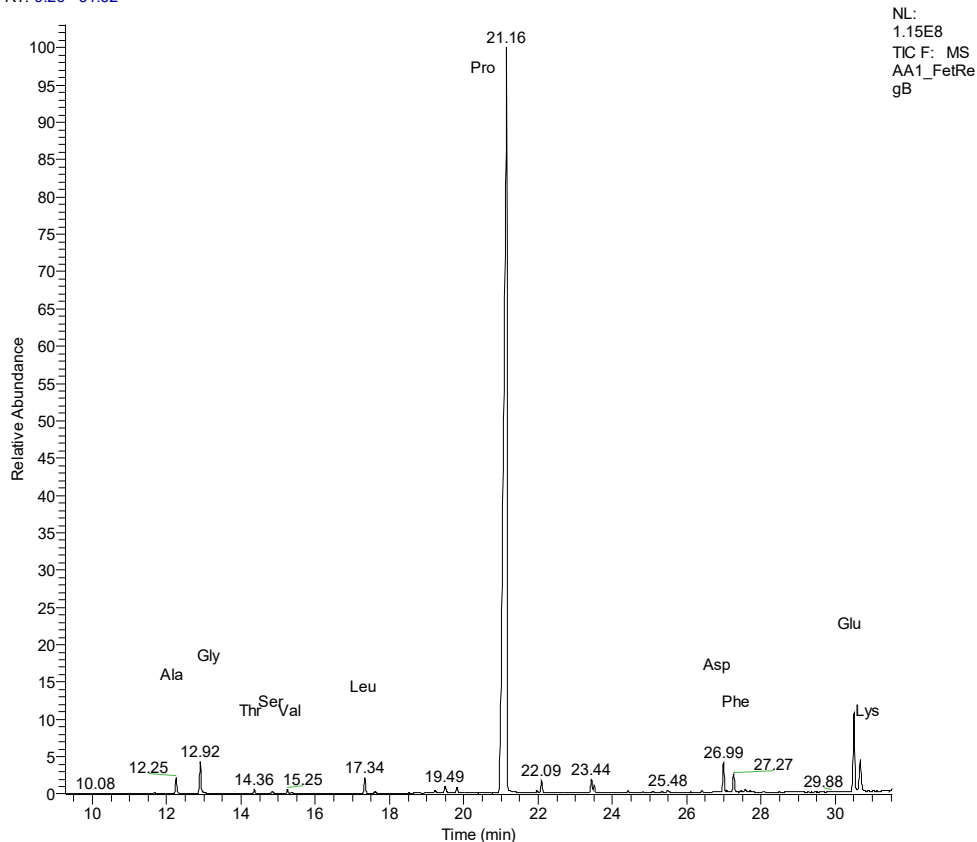
Acizi grași	TR	Medie $\pm$ DS (%masă)
acid hexadecanoic (C16:0)	22.27	20,33 $\pm$ 4.53
acid 9,12 octadecadienoic (C18:2)	24.28	8,79 $\pm$ 2.04
acid octadecanoic (C18:0)	24.62	6,86 $\pm$ 0.62
$\Sigma$ SFA <sup>a</sup>		<b>27,19</b>
$\Sigma$ UFA <sup>b</sup> / $\Sigma$ SFA		<b>2,68</b>

<sup>a</sup>SFA: acizii grași saturați C16:0, C18:0; <sup>b</sup>UFA: acizii grași nesaturați: C18:2,

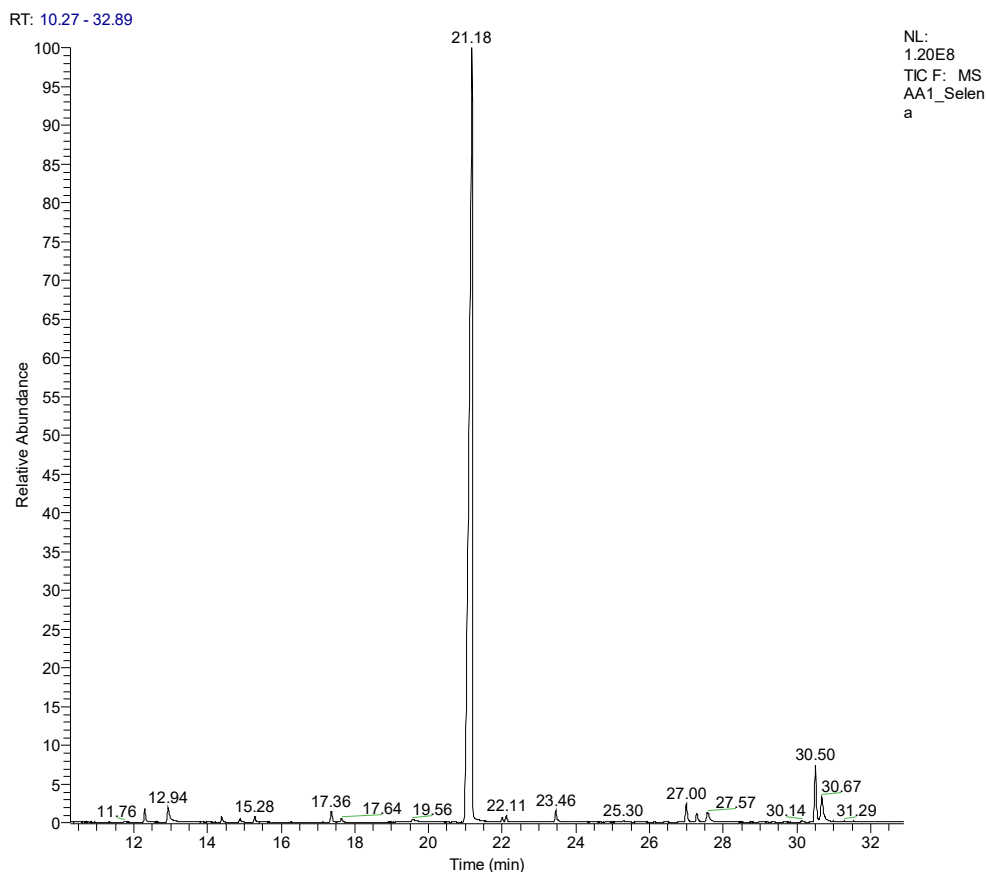
SFA – acizi grași saturați (saturated fatty acids);

UFA– acizi grași nesaturați (unsaturated fatty acids);

RT: 9.26 - 31.52



**Fig. 4.10.** Cromatograma de separare a aminoacizilor din Feteasca Regala Blaj

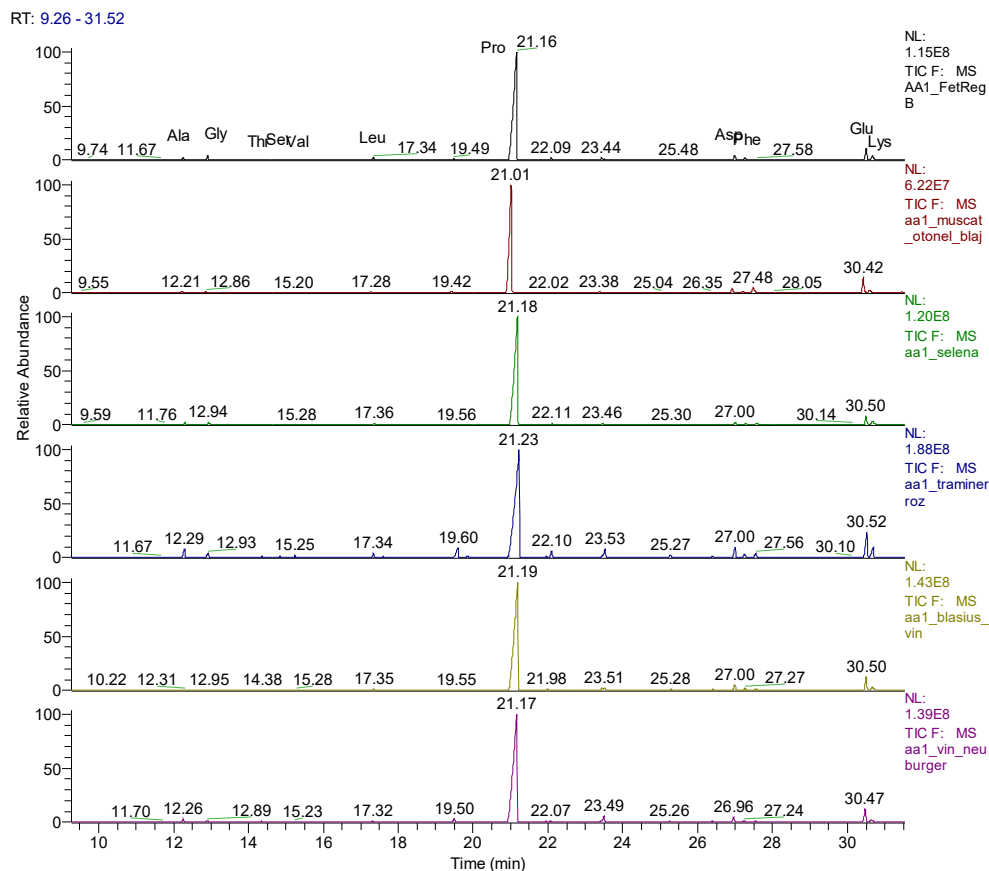


**Fig. 4.11.** Cromatograma de separare a aminoacizilor din vinul Selen. Blaj

Dupa cum se poate observa, prolina este principalul aminoacid găsit în probele de vin.

Au fost studiate șase vinuri albe din podgoria Blaj (Fetească regală, Blasius, Neuburger, Traminer roz, Muscat Ottonel, Selen). S-au comparat caracteristicile lor fizico-chimice și aminoacizii liberi. În cazul aminoacizilor au fost derivatizați în esteri trifluoracetici pentru a îmbunătăți volatilitatea și pentru o mai bună separare. Conținutul în aminoacizi este influențat în principal de soiurile de struguri, originea geografică și starea de fermentație. Aminoacizii dominanți identificați în vinuri au fost prolina (15,7 mg/ml în Blasius), acid glutamic, acid aspartic, acid gama-aminobutiric, alanină, glicină și lizină. Prolina este principalul aminoacid din probele de vin, eliberat în fermentații, fiind un produs intermediar în degradarea argininei [41]. Concentrațiile ridicate de prolina în vin se datorează faptului că microorganismele de drojdie nu consumă acest aminoacid. Arginina nu a fost găsită în vin deoarece este consumată în timpul fermentației cu drojdie [16]. Aminoacizii liberi totali au fost în intervalul 10,2 mg/ml (Feteasca Regala Blaj) și 19,2 mg/ml (Traminer Roz Blaj). Aminoacizii esențiali (EAA) au avut valori cuprinse între

0,45 mg/ml (Neuburger) și 1,44 mg/ml (Traminer Roz). Acizii grași prezenți în vinuri au fost mai mici de 20  $\mu$ g/ml, acidul stearic, acidul palmitic și acidul linoleic fiind dominanți.



**Fig. 4.12.** Cromatogramele de separare comparative ale aminoacizilor

O comparare a aminoacizilor din șase tipuri de vin diferite, este prezentat în Tabelul 4.1. în care sunt comparate valorile aminoacizilor liberi întâlniți. Aminoacizii esențiali sunt marcați cu \*.

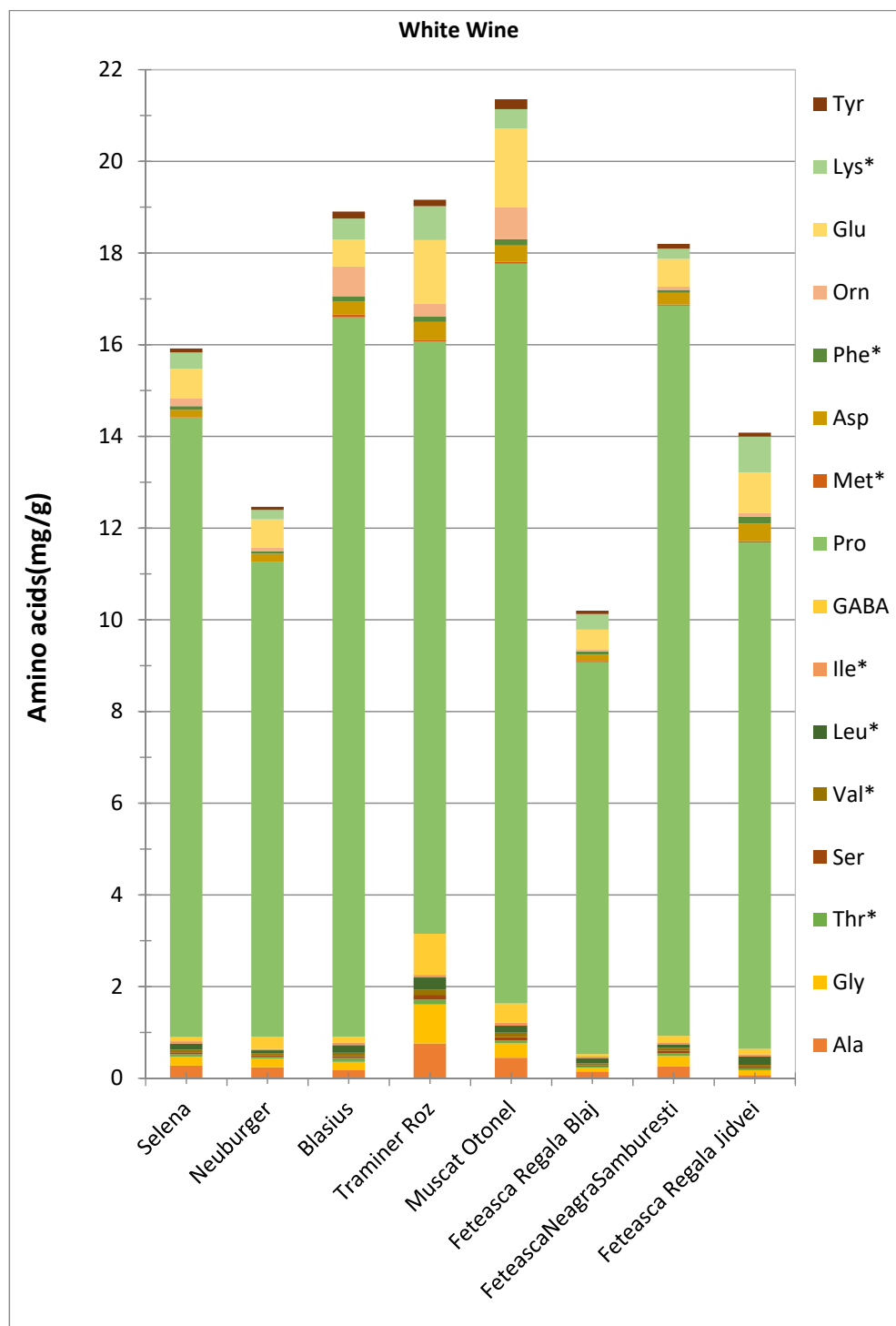


**Tabel 4.4.** Compararea valorilor aminoacizilor liberi întâlniți în vinurile studiate

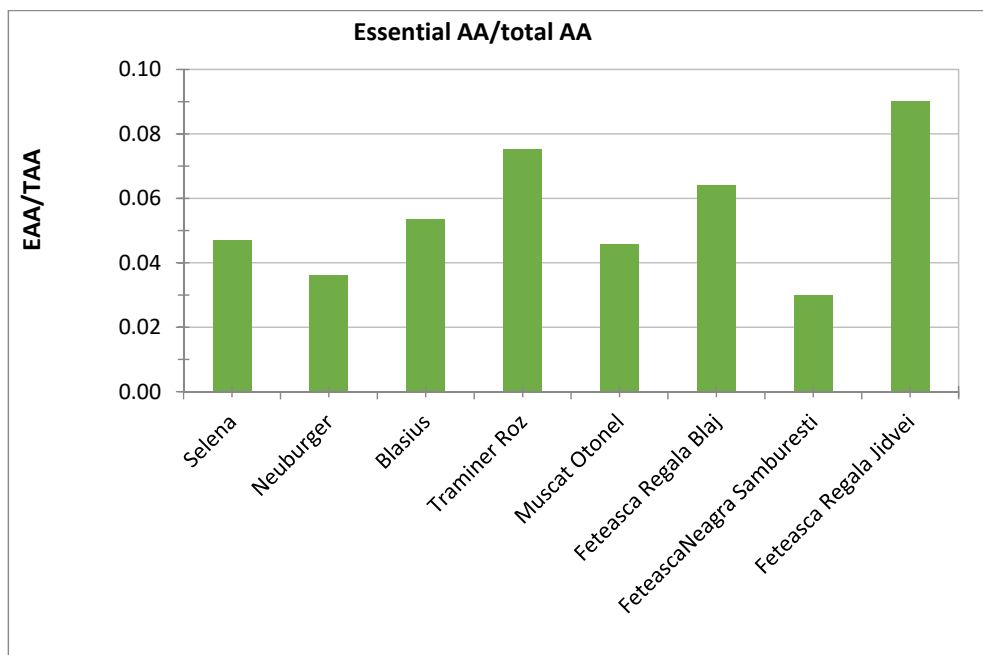
		Selena	Neuburger	Blasius	Traminer Roz	Muscat Otonel	Feteasca Regală Blaj
		Vin Blaj	Vin Blaj	Vin Blaj	Vin Blaj	Vin Blaj	Vin Blaj
	AA	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g
1	Ala	0,28	0,24	0,17	0,76	0,45	0,15
2	Gly	0,20	0,19	0,19	0,85	0,31	0,08
3	Thr*	0,05	0,04	0,08	0,10	0,06	0,03
4	Ser	0,04	0,03	0,04	0,10	0,07	0,02
5	Val*	0,06	0,04	0,07	0,12	0,10	0,04
6	Leu*	0,13	0,07	0,17	0,26	0,15	0,12
7	Ile*	0,05	0,03	0,05	0,06	0,07	0,03
8	GABA	0,09	0,27	0,13	0,89	0,42	0,05
9	Pro	13,50	10,35	15,69	12,92	16,14	8,55
10	Met*	0,02	0,01	0,07	0,03	0,04	0,03
11	Asp	0,16	0,17	0,28	0,39	0,36	0,14
12	Phe*	0,08	0,06	0,12	0,12	0,14	0,07
13	Orn	0,16	0,08	0,65	0,28	0,69	0,04
14	Glu	0,65	0,61	0,59	1,39	1,72	0,44
15	Lys*	0,36	0,21	0,45	0,74	0,42	0,34
16	Tyr	0,09	0,07	0,15	0,14	0,22	0,07
17	His*						

**Tabel 4.5.** Cantitatea de aminoacizi liberi totali  
și aminoacizi esențiali și raportul acestora

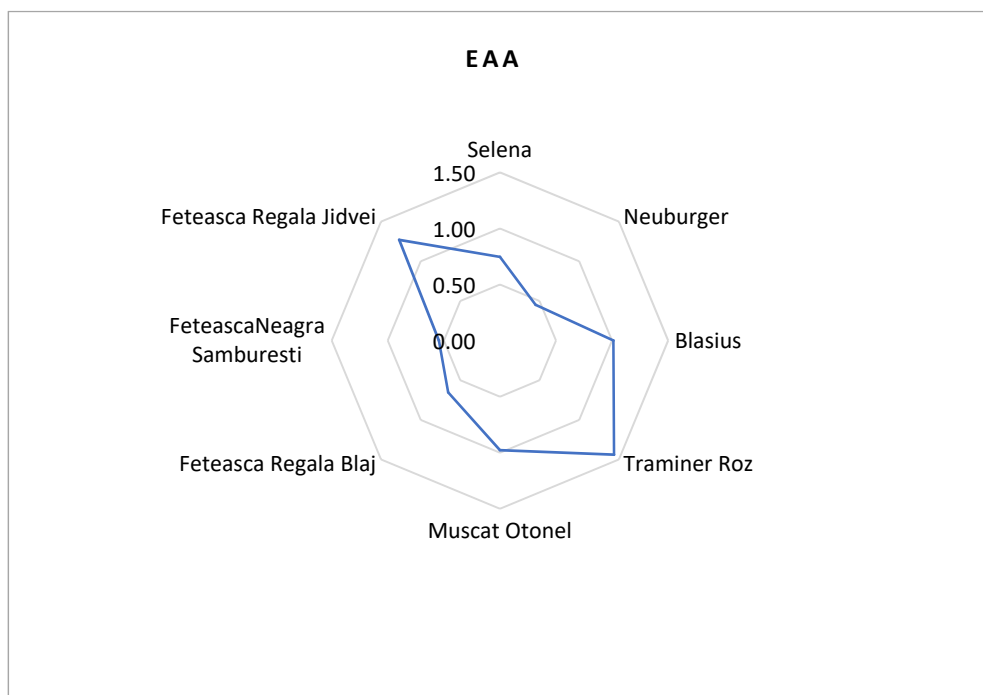
	Selena	Neuburger	Blasius	Traminer Roz	Muscat Otonel	Feteasca Regală Blaj
TAA	15,92	12,46	18,90	19,16	21,35	10,20
EAA	0,75	0,45	1,01	1,44	0,98	0,65
EAA/TAA	0,05	0,04	0,05	0,08	0,05	0,06



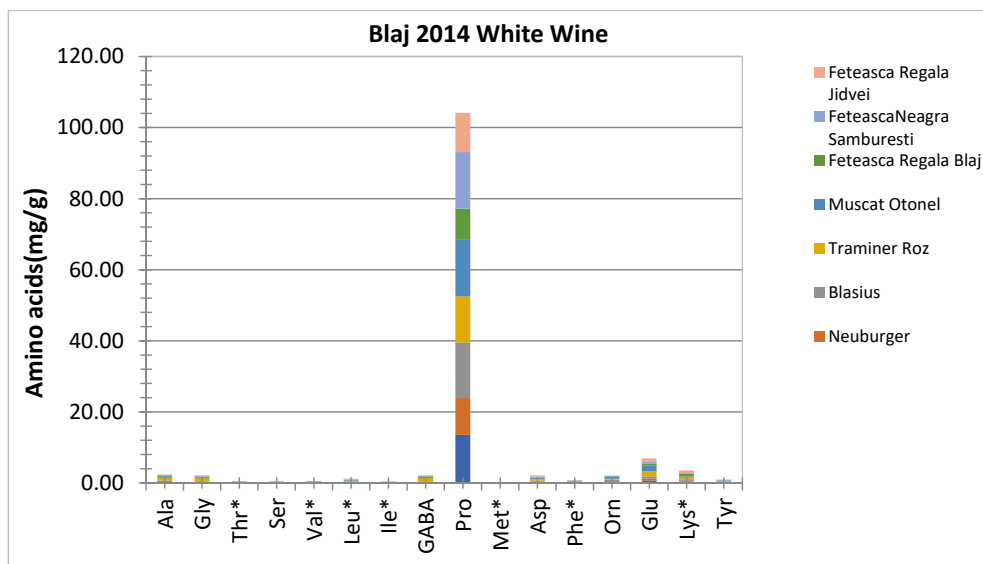
**Fig. 4.13.** Aminoacizii liberi în vinurile românești



**Fig. 4.14.** Raportul dintre aminoacizii esențiali și aminoacizii totali



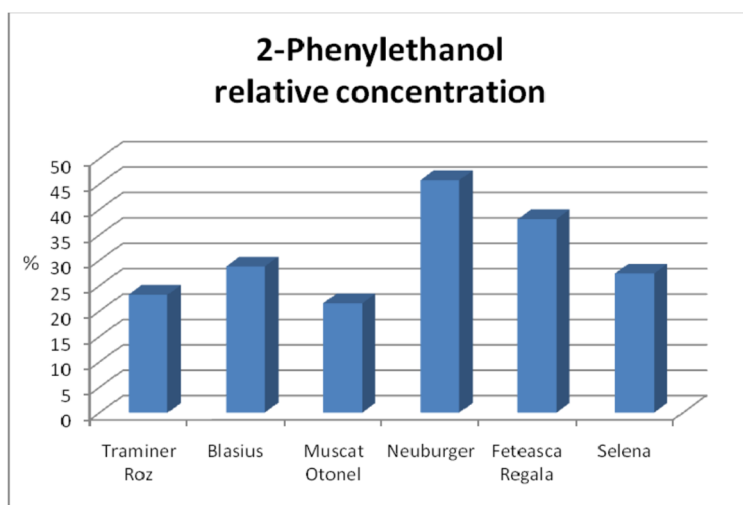
**Fig. 4.15.** Compararea aminoacizilor esențiali (mg/g)



**Fig. 4.16.** Compararea aminoacizilor din vinuri albe de Blaj cu unul de Jidvei și vin roșu Fetească neagră ( mg/g)

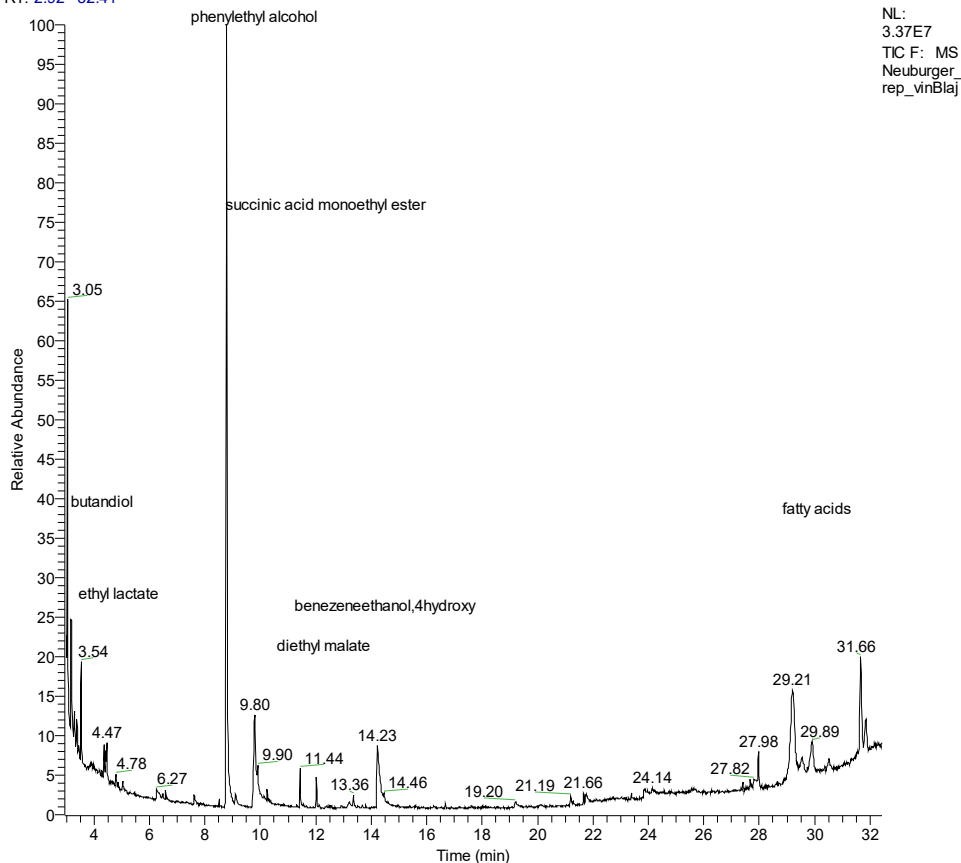
În Fig. 4.16 este evidențiată cantitatea mare de prolină, important aminoacid esențial, în vinurile studiate, explicată prin degradarea argininei în prolină în tehnologia de fermentație (Ciência Téc. Vitiv. 30(2) 84–93, 2015).

Extratele volatile de vin au dat compuși foarte asemănători. Compușii principali determinați au fost 2-feniletanolul (21,5% – Muscat Otonel până la 45,76% – Neuburger), monoetil esterul acidului succinic (17,29% – Neurger la 37,4% – Blasius) și 4-hidroxifeniletanol (6,7% în Muscat Otonel până la 15,37% Feteasca Regală). [11]

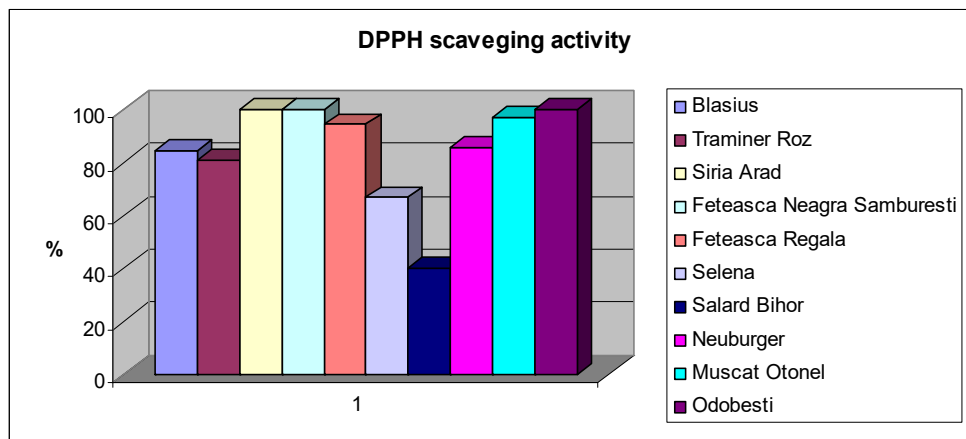


**Fig. 4.17.** Concentrația relativă a 2-feniletanolului în diferite vinuri din zona Blaj

RT: 2.92 - 32.41



**Fig. 4.18.** Separarea cromatografică și identificarea prin GC/MS a compușilor volatili din vin (Neuburger)



**Fig. 4.19.** Activitatea antioxidantă în vinurilor studiate

Se știe că flavonoidele care se găsesc în pielea strugurilor, sunt foarte sănătoase, dar dau gust amar vinului [43]. De aceea producătorii de vinuri albe nu folosesc pielea de struguri pentru a nu modifica gustul vinului. De asemenea, conținutul de flavonoide din vinurile albe nu este la fel de ridicat ca în cazul vinurilor roșii, datorită cantității inițiale scăzute de flavonoide din struguri albi. Toate vinurile albe studiate au o cantitate mică de flavonoide, cea mai mare cantitate fiind găsită în vinul Selenia 8,96 mg QuE/L.

Activitatea antioxidantă a vinurilor studiate, efectuată prin metoda DPPH (2,2 difenil-picril-hidrazil), s-a comparat cu cea a câtorva vinuri roșii; Fetească neagră de Sâmburești, Siria Arad Salard Bihor (vin de casă), Vin de Odobești (Fig. 4.19). Se observă că tehnologia de vinificație se reflectă în capacitatea antioxidantă a acestora.

## 4.7. Concluzii

Metoda de analiză dezvoltată în acest experiment prezintă parametri de validare buni (precizia < 20% DSR, LOD < 10  $\mu\text{g/mL}$ , 10 ng injectate). Aminoacizii sunt importanți pentru mirosul și aroma vinului, fiind implicați în metabolismul drojdiilor. Toate vinurile albe din Blaj conțin o cantitate mare de prolină în comparație cu ceilalți aminoacizi. S-au comparat aminoacizii esențiali importanți. Traminer Rose, Feteasca Regală de Jidvei, Blasius, Muscat Otonel au avut cantitatea de aminoacizi esențiali mai mare. Acizii grași au fost găsiți în cantități foarte mici. Probele analizate variază atât ca și compoziție, dar mai ales în ceea ce privește raportul cantitativ al componentelor de aromă caracteristici. Metodele de extracție descrise sunt utile în caracterizarea vinurilor (bucetul vinului, amprenta GC în ceea ce privește volatilele extrase) precum și pentru caracterizarea amănunțită a compușilor din vinuri. Metoda GC-MS este cea mai indicată metoda pentru analiza calitativă și cantitativă a componentelor organici volatili, al buchetului vinurilor și al unor principii active din vinuri.



## Capitolul V

### Analiza prin GC-MS și diluție izotopică a aminoacizilor din semințe

#### 5.1. Efectele benefice ale extractelor din semințe asupra organismului uman

Fructele și legumele sunt legate de reducerea riscului de dezvoltare a problemelor de sănătate. Pe lângă faptul că contribuie la gust și culoare, micronutrienții contribuie la protecția împotriva tulburărilor de sănătate, cum ar fi bolile cardiovasculare și cancerul, diabetul de tip 2, obezitatea și constipația [44]. Domeniul cercetării nutriționale în plante de o importanță mai mică pentru om poate servi ca o veritabilă sursă de proteină vegetală din cauza costurilor crescute ale surselor convenționale de înaltă calitate [45]. Aminoacizii liberi au un efect important în aroma mâncării, influențează gustul și contribuie la formarea de amine și compuși volatili [46]. A fost elaborată o metodă de cromatografie în gaz-spectrometrie de masă (GC-MS) pentru determinarea aminoacizilor liberi din unele semințe.

În ultimii ani, interesul în ceea ce privește nutriția și calitatea produselor alimentare a crescut datorită importanței acestora în sănătatea umană. Specificitatea și sensibilitatea spectrometriei de masă (MS) a devenit oficial recunoscută în produsele alimentare, controlul calității și siguranței [47–59]. Micronutrienții ajută la protejarea împotriva tulburărilor de sănătate, cum ar fi bolile cardiovasculare și cancer [61]. Acidul gras Omega-3 folosit ca supliment pentru pacienți are efecte benefice asupra scorului subiectiv de evaluare globală și a profilurilor metabolice [62], [124]. Omega 3 este unul din acizii grași polinesaturați (PUFA) definit ca un acid gras esențial; este important pentru sănătatea umană, deoarece nu poate fi sintetizat de corpul uman [63].

Pentru o dietă mai echilibrată și mai sănătoasă, alimentele vegetale sunt benefice deoarece conține fitonutrienți [64]. Uleiul de semințe de in, de exemplu, are mai mult de 50% acid linolenic [65].

Determinarea mineralelor și a oligoelementelor este, de asemenea, importantă. Unele metale, inclusiv fier, magneziu, zinc și cuprul sunt micronutrienți esențiali, având importanță în funcțiile biochimice în toate organismele vii.



Sămânța reprezintă viața unei plante. Ea este un aliment viu, plin de nutrienți, cu beneficii foarte mari pentru sănătate, așa că este bine să introduci în alimentație cât mai des cele mai bune semințe pentru organism, prin intermediul salatelor, a iaurturilor, a cerealelor sau a smoothie-urilor. **Semințele trebuie consumate crude pentru a beneficia de componentele nutriționale. Prin gătitul lor, ele se transformă în alimente moarte.** Dacă vrei să consumi cele mai bune semințe pentru organism trebuie să mai știi că ele trebuie înmuiate, pisate, zdrobite sau rășnițate, pentru a elibera toți nutrienții în organism [61].

**Semințele de chia** sunt foarte bune pentru organism prin conținutul de vitamine, minerale, fibre, proteine, antioxidanți, acizi grași omega-3. Consumul de semințe chia contribuie la controlul greutății, reduce durerea de articulații, protejează împotriva bolilor cardiovasculare, diabetului. 2 linguri de semințe de chia (30g) conțin:

- 11 g. de fibre
- 4 g. de proteine
- 9 g. de grăsimi din care 5 g sunt Omega 3
- 18% din doza zilnică necesară de Calciu
- 30% din doza zilnică necesară de Mangan
- 30% din *doza zilnică necesară* de Magneziu
- 27% din doza zilnică necesară de Fosfor
- Mai conțin și o importantă cantitate de Zinc, Vitamina B1 (Tiamină), B2, B3, și Potasiu [68].

**Semințele de cânepă** sunt considerate unele dintre cele mai bune semințe pentru organism. Conțin cei 20 de aminoacizi, incluzând cei 9 aminoacizi esențiali pe care organismul uman nu îi poate produce, un procent mare de proteine care întăresc imunitatea, fiind utile în detoxifiere. Sunt o sursă bogată de acizi grași esențiali, mai mult ca semințele de in, au rol benefic pentru sistemul imunitar, sistemul circulator, celule, țesuturi, organe și piele. Semințele de cânepă sunt bogate în fibre și vitaminele A, C și E, dar conțin și vitaminele B1, B2, B3, B6, D. În compoziția lor regăsim și minerale precum calciu, fosfor, magneziu, mangan, sulf, potasiu și fier și zinc într-un procent mai mic. Semințele de cânepă conțin antioxidanți excelenți precum vitamina E. Tocoferolul (vitamina E) este cunoscut pentru rolul sau benefic în boli precum Alzheimer și aterosleroza.

**Semințele de in** sunt o sursă bună de energie și au proprietăți antioxidante. Conțin fibre care opresc creșterea nivelului lipidelor din sânge, diminuează apetitul și contribuie la menținerea greutății corporale, reglează metabolismul, reduc colesterolul, scad riscul apariției infarctului și a atacului cerebral. Inul se cultivă de secole și proprietățile lui benefice sunt lăudate peste tot pe glob, ele fiind considerate ca fiind unele din cele mai bune semințe pentru organism.

100 de g de in contin: Calorii: 534, Lipide totale: 42 g, Colesterol: 0 mg, Sodiu: 30 mg, Potasiu: 813 mg, Carbohidrați: 29 g, Fibre alimentare: 27 g, Zahar: 1.6 g, Proteine: 18 g, Vitamina C: 1%, Calciu: 25%, Vitamina B-6: 25%, Fier: 31%, Magneziu: 98%. [69]

**Semințele de dovleac** conțin fibre alimentare, acizi grași nesaturati, buni pentru în boli cardiovasculare, proteine, minerale, precum fosfor, magneziu, mangan, fier și cupru, zinc și vitamina K. Conține Triptofan, precursor al serotoninei, al acidului gama-amino-butiric. Triptofanul ajută în insomnii și depresie. Conțin fitosteroli, compuși care reduc nivelul colesterolului LDL (colesterolul rău). Conține zinc, care protejează împotriva osteoporozei.

Sunt alimente alcaline. Conțin vitamine din grupul B (tiamina, riboflavina, niacina, acid pantotenic, vitamina B6 (piridoxina) și acid folic). Conțin proteine de buna calitate. 100 g de semințe furnizează 30 g de proteină. Semințele de dovleac previn formarea pietrelor la rinichi. Reduc inflamația în cazul artritelor fără a avea efectele secundare ale medicamentelor.

Sunt folosite în multe culturi populare drept tratament natural împotriva teniei și altor paraziți. Sunt bune în menținerea sănătății prostatei [68].

**Semințele de susan** conțin mult calciu, fibre și minerale esențiale pentru sănătatea organismului și a pielii (magneziu, fier, fosfor, vitamina B1, zinc și triptofan). Calciul și vitamina D din semințele de susan, scad riscul osteoporozei. Susanul e benefic în boli respiratorii, diaree, dizenterie, reglarea ciclului menstrual, infecții urinare. Semințele de susan combat hemoroizii, constipațiile, indigestiile, contribuind la o bună digestie și asimilație. Cuprul din semințele de susan are rol important în absorbția fierului, fiind util în anemie și ajută bolnavii cu artrită reumatoidă.

**Semințele de struguri.** Semințele de struguri prezintă o mare concentrație de vitamina E, flavonoizi, acizi linoleici și polifenoli. Polifenolii stimulează producția de collagen și elastină care mențin pielea catifelată. Tot polifenolii ajută și la circulația sângelui de la nivelul pielii. Sunt unele dintre cele mai bune semințe pentru organism deoarece extractele pot preveni bolile cardiace precum hipertensiunea și colesterolul mărit. Limitând oxidarea lipidelor, semințele de struguri pot reduce și alte afecțiuni cardiace, prin inhibarea proliferării trombocitelor și reducerea inflamațiilor [68].

**Semințele de mac.** Minusculele semințe negre sau cenușii au valori atât nutriționale, cât și medicinale. Sunt sursă de fibre, ajută la reducerea nivelului colesterolului „rău” și au acțiune analgezică. Macul de grădină (Papaver somniferum), o specie des întâlnită, produce aceste mici semințe oleaginoase, care sunt folosite pe post de condiment în industria alimentară. Dincolo de aroma unică pe care o oferă preparatelor dulci sau sărate, semințele de mac au proprietăți antioxidante, contribuie la prevenirea bolilor și ajută la menținerea frumuseții pielii și a părului. Macul este principala sursă de opium, substanță folosită ca somnifer, calmant, analgezic și stupefiant. Opiumul este

un suc lăptos secretat de capsulele necoapte care conține o serie de alcaloizi cunoscuți sub numele de opiacee: morfina, codeina, papaverina și tebaina. Învelișul exterior al semințelor de mac este o sursă excelentă de fibre. 100 g de semințe de mac crude conțin 19,5 g fibre, jumătate din doza zilnică recomandată. Bogate în calciu, fosfor, fier și zinc, semințele de mac ajută la remineralizarea organismului. 1 linguriță de semințe conțin 4% din doza zilnică recomandată de fosfor și calciu. Adulții au nevoie atât de fosfor, cât și de calciu pentru a evita boli precum osteoporoza. Sunt o sursă de fier, care transportă oxigenul în tot corpul și contribuie la crearea proteinelor și neurotransmițătorilor, îmbunătățind astfel sistemul imunitar. O linguriță de semințe de mac furnizează 4% din doza recomandată de fier pentru bărbați și 3% din cea recomandată pentru femei[61].

**Nucile** sunt un aliment care concentrează nutrienți ca- vitamine, grăsimi, antioxidanți și minerale – fiind recomandate pentru întărirea și protejarea sistemului cardiovascular și a inimii. Miezul de nucleă este relativ sărac în aminoacidul esențial *metionină*, dar bogat în aminoacizii esențiali *lizină* și *treonină*.

Bogate în substanțe fitochimice, ce contribuie la activitatea antioxidantă, nucile conțin vitamina E, carotenoidele, melatonina, acidul elagic și compuși polifenolici care ajută organismul în lupta împotriva bolilor neurologice, cancerului, inflamațiilor, îmbătrânirii. Conțin vitamina E, în special în gamma- tocopherol, 21g/100 g, antioxidant necesar protejării membranei celulare. Conțin vitamina B6, acidul pantothenic, niacinul, riboflavina, tiaminul. Constituie, în același timp și o bogată sursă de minerale: potasiu, fier, calciu, cupru, mangan, zinc, magneziu, seleniu [44, 61].

**Semințele de pepene verde** conțin aminoacizi esențiali importanți: arginina, care reglează tensiunea arterială, triptofan, care ajută la reglarea secreției de melatonină, hormon care ajută la inducerea somnului, acid glutamic și lizină. Sunt bogate în lichen, un antioxidant puternic ce se găsește și în roșii. Mai mult, semințele pepenelui conțin și un nivel foarte ridicat de magneziu și zinc.

**Alune de padure.** Sunt bogate în proteine, fibre, vitaminele A, B, C și E, calciu, fier, fosfor, potasiu, mangan, cupru, magneziu, seleniu, sodiu și zinc. Conțin acizi grași și aminoacizi (alanine, arginina, acid aspartic, acid glutamic și leucina), conțin cantitate dublă de vitamina E comparativ cu uleiul de măsline.

**Migdalele** conțin acizii grași esențiali, fibre, vitamina E, magneziu, proteine, cupru, potasiu, mangan, calciu, fosfor, fier, vitamine din grupul B, riboflavina, biotina, zinc. Un consum zilnic de migdale satisface necesarul de magneziu și calciu, necesari în tonifierea mușchilor, oaselor, prevenind osteoporoza.

**Porumbul** conține acizi grași nesaturați (85 – 90%), amidon, albumine, vitamine din grupa B, vitamina E, vitamina K, fier, zinc, potasiu, fosfor, magneziu și fibre. Prin fierbere se păstrează cca 60% din substanțele nutritive. Are efect împotriva stresului, e bogat în

vitaminele din grupa B, mai ales în vitamina B1, care acționează asupra funcționării sistemului nervos, a mușchilor, a inimii, a producției de globule roșii. Vitamina E, protejează împotriva artritei, scade nivelul colesterolului, reduce riscul de ateroscleroză și infarct, ajută în procesul de reînnoire celulară. Porumbul fiert conține potasiu, necesar pentru buna funcționare a mușchilor și a inimii [61].

## **5.2. Obiectivul studiului**

Scopul acestui studiu a fost de a compara conținutul de aminoacizi și activitatea antioxidantă a unor semințe (de exemplu, semințe de in, mac, struguri, cânepă, nuci, dovleac, susan, pepene verde, chia, porumb, migdale și alune) utilizate ca suplimente alimentare. Au fost evaluate atributele antioxidante ale extractelor de sămânță utilizând teste antioxidante cu DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazil) care capturează radicalii liberi. [124]

Spectrometria de masă și cromatografia de gaz (GC-MS) a fost utilizată pentru analiza aminoacizilor în mai multe semințe selectate [60, 62–67]. Metoda implică o procedură de extracție, derivatizare și analiza GC-MS.

## **5.3. Materiale și metode**

### **5.3.1. Reactivi și probe biologice**

Semințele au fost achiziționate pe piața românească, unele dintre ele fiind din Grădina Botanică, Târgu Mureș, România.

A fost utilizat un cromatograf de gaze Trace GC cuplat cu spectrometrul masă cuadrupolar Trace DSQ (Thermo Finnigan). Cromatograful de gaze a fost echipat cu o coloană capilară RTX-5MS (ID 30 m × 0,25 mm, grosimea filmului 0,25 μm).

Fiecare eșantion a fost extras în duplicat.

Probele de semințe au fost uscate, omogenizate și apoi trecute printr-o sită de 20 de ochiuri pentru a obține particule foarte fine.

Soluția standard de înaltă puritate ICP Multi Element Standard XXI CertiPUR obținută de la Merck (Darmstadt, Germania) a fost utilizată pentru analiza cantitativă a curbei de calibrare.

### **5.3.2. Extracția aminoacizilor din semințe**

100 mg de semințe (semințe de in, struguri, mac, cânepă, nuci, dovleac, susan, pepene verde, chia, struguri, alune, migdale și porumb) zdrobite au fost extrase cu 1 ml de acid

tricloroacetic 6% într-o baie cu ultrasunete timp de 5 minute. Amestecul a fost centrifugat timp de 5 min la 6000 rpm și supernatantul a fost colectat pentru purificare.

S-au trecut 0,5 ml supernatant și 50  $\mu\text{g}$  [ $^{15}\text{N}$ ]-glicină (standard intern) printr-o coloană Dowex 50W-W8, coloană 4  $\times$  40 mm (activată). Soluția colectată a fost uscată într-un curent de azot la 60 °C prin vid centrifugal la 60 °C.

100 mg de semințe au fost extrase cu 1 ml etanol la 60 °C într-o baie cu ultrasunete timp de 15 minute. Amestecul a fost centrifugat la 5800 rpm și supernatantul a fost colectat și testat pentru activitate antioxidantă. Pentru determinarea activității antioxidante s-a utilizat testul antioxidant DPPH. S-au folosit 100  $\mu\text{L}$  (10 mg/ml sămânță) din fiecare extract .

### 5.3.3. Derivatizarea aminoacizilor

Pentru esterificarea funcției carboxilice s-au utilizat 200  $\mu\text{L}$  de butanol: clorură de acetil (4:1 v/v), timp de o oră la 110 °C, urmată de o acetilare a funcției aminice folosind 100  $\mu\text{L}$  anhidridă trifluoracetică, timp de 20 min la 80 °C .

Reacțiile au avut loc în fiole de sticlă cu capac cu garnitură de teflon și cauciuc siliconic, într-un cuptor special construit ce permite controlul temperaturii.

## 5.4. Aparatura experimentală

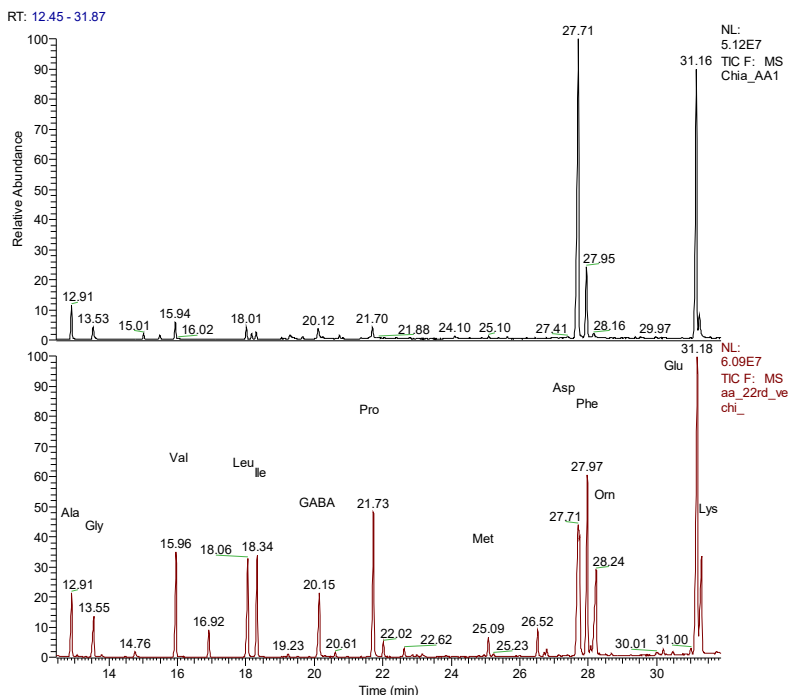
Analiza probelor s-a realizat cu ajutorul unui gaz-cromatograf cuplat cu un spectrometru de masă cu analizor cuadrupolar Trace DSQ (Thermo Finnigan). Separarea compușilor a avut loc pe o coloană capilară Rtx-5MS (fază staționară nepolară: 5% difenil/95% di-metil polisiloxan), cu următoarele dimensiuni: 30m lungime  $\times$  0.25mm diametru intern, cu grosimea filmului de 0.25  $\mu\text{m}$ . Programul de temperatură al cuptorului cromatografic a fost, pentru aminoacizi: 70 °C, menținere 2 min, 5 °C/min până la 110 °C, 10 °C/min până la 290 °C, 16 °C/min până la 300 °C, menținere 3 min. Gazul purtător a fost He 5.5, cu debitul de 1 mL/min.

Ionizarea s-a realizat prin impact de electroni (70 eV, energia electronilor) și curentul de emisie a fost de 100  $\mu\text{A}$ . Temperatura liniei de transfer a fost stabilită la 250 °C, temperatura injectorului, la 200 °C, iar temperatura sursei de ioni, la 250 °C. S-a injectat automat câte 1  $\mu\text{L}$  de probă, în modul split (10:1), folosind un autosampler Triplus. Spectrometrul de masă a funcționat în modul SCAN, înregistrând masa în domeniul: 50–500 u.a.m.

## 5.5. Rezultate și discuții

Metoda elaborată este selectivă și specifică. Spectrele de masă înregistrate pe fiecare pic cromatografic permit identificarea precisă a aminoacizilor, utilizând biblioteca de spectre NIST. De asemenea, suprapunerea componentelor este ușor evidențiată. Metoda a fost validată utilizând aminoacizi etalon. Aminoacizii dominanți identificați în semințe au fost acidul glutamic, acidul aspartic, prolina, glicina, lizina, alanina, histidina (în pepene verde) și tirozina din semințele de in. Fig. 5.1 prezintă cromatogramele de separare a aminoacizilor liberi din Chia: (Gly: 13.53min; Thr: 15.01 min; Val: 15.94 min; Pro: 21.7min; Asp: 27.71 min; Glu: 31.16 min) cât și a aminoacizilor etalon.

Cele mai mari valori pentru aminoacizii liberi (TAA), în mg/g, au variat de la mac (1,98), pepene verde (1,91), migdale (1.77), dovleac (1.73), câneapă (1.61) g, la semințele de in, (0,25) (tabelul 5.1, figura 5.4). Aminoacizii esențiali (EAA), prezentați în tabelul 1 (marcat cu \*), variază în semințe în ordinea: pepene verde, dovleac, câneapă, migdale, chia, mac, susan, struguri, alune, nuci, semințe de in și porumb (Figura 5.2). În figura 5.3. este prezentată variația raportului EAA/TAA din pepene verde, susan, chia, dovleac, struguri, alune, semințe de in, câneapă, migdale, nuci, mac, porumb.



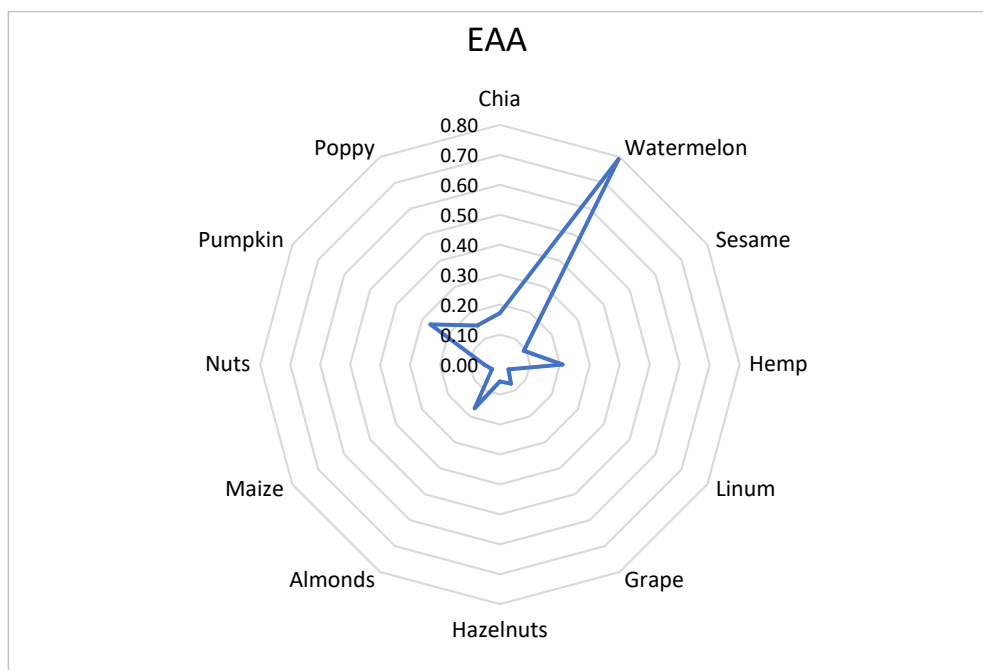
**Fig. 5.1.** Cromatogramele de separare a aminoacizilor liberi din Chia: (Gly: 13.53 min; Thr: 15.01 min; Val: 15.94 min; Pro: 21.7 min; Asp: 27.71 min; Glu: 31.16 min) (sus) și a aminoacizilor etalon (jos).

**Tabel 5.1.** Compararea valorilor aminoacizilor liberi întâlniți în semințele studiate

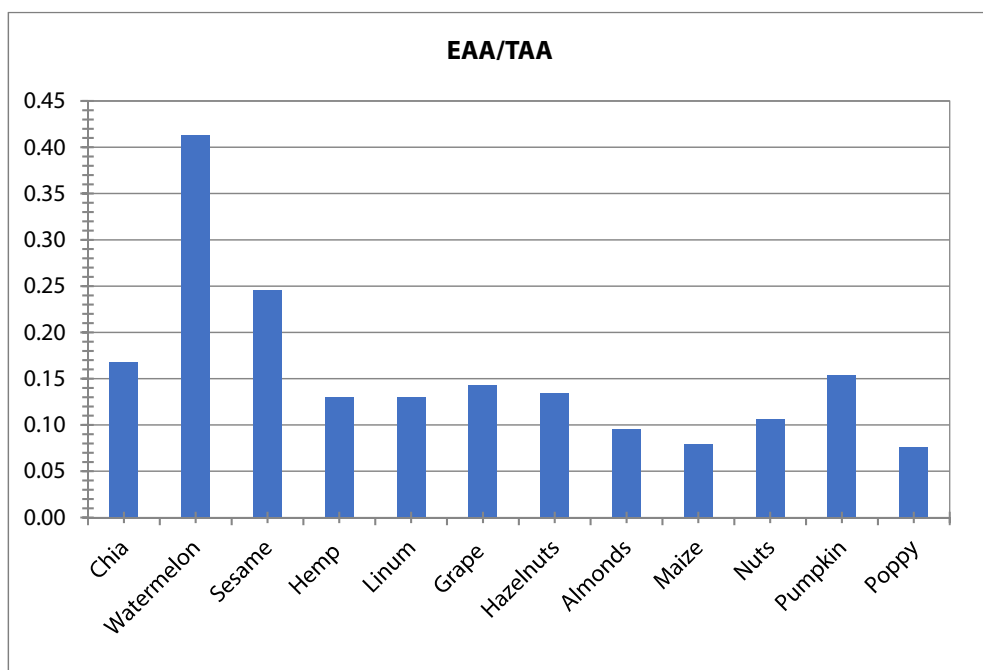
	Semințe	Chia	Pepene verde	Susan	Câneță	In	Struguri	Alune	Migdale	Porumb	Nuci	Dovleac	Mac
	AA	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g
1	<b>Ala</b>	0,07	0,06	0,04	0,12	0,01	0,03	0,07	0,06	0,022	0,03	0,14	0,08
2	<b>Gly</b>	0,09	0,10	0,05	0,04	0,02	0,05	0,09	0,09	0,026	0,09	0,37	0,61
3	<b>Thr*</b>	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,005	0,00	0,031	0,016
4	<b>Ser</b>	0,03	0,03	0,01	0,01	0,01	0,002	0,01	0,02	0,004	0,01	0,04	0,02
5	<b>Val*</b>	0,02	0,02	0,01	0,04	0,00	0,01	0,01	0,03	0,006	0,01	0,04	0,02
6	<b>Leu*</b>	0,01	0,03	0,01	0,02	0,00	0,01	0,01	0,01	0,004	0,01	0,03	0,02
7	<b>Ile*</b>	0,01	0,03	0,01	0,04	0,00	0,01	0,006	0,03	0,004	0,01	0,03	0,02
8	<b>GABA</b>	0,01	0,04	0,05	0,08	0,000	0,01	0,01	0,00	0,013	0,03	0,06	0,02
9	<b>Pro</b>	0,01	0,03	0,01	0,35	0,00	0,04	0,03	0,18	0,086	0,03	0,04	0,06
10	<b>Met*</b>	0,00	0,00	0,004	0,003	0,002	0,002	0,01	0,00	0,000	0,000	0,000	0,007
11	<b>Asp</b>	0,21	0,06	0,05	0,27	0,10	0,09	0,05	0,94	0,126	0,039	0,11	0,28
12	<b>Phe*</b>	0,05	0,03	0,03	0,03	0,01	0,02	0,01	0,02	0,004	0,015	0,08	0,01
13	<b>Orn</b>	0,04	0,06	0,002	0,00	0,000	0,01	0,01	0,01	0,001	0,009	0,03	0,01
14	<b>Glu</b>	0,32	0,72	0,06	0,50	0,054	0,21	0,08	0,27	0,068	0,209	0,50	0,72
15	<b>Lys*</b>	0,06	0,10	0,02	0,05	0,000	0,01	0,01	0,05	0,009	0,009	0,06	0,06
16	<b>Tyr</b>	0,07	0,02	0,01	0,03	0,01	0,01	0,02	0,02	0,004	0,002	0,16	0,04
17	<b>His*</b>		0,57										

**Tabel 5.2.** Cantitatea de aminoacizi totali și aminoacizi esențiali întâlniți și raportul acestora

	Chia	Pepene verde	Susan	Câneță	In	Struguri	Alune	Migdale	Porumb	Nuci	Dovleac	Mac
TAA	1,02	1,91	0,38	1,61	0,25	0,52	0,42	1,77	0,38	0,50	1,73	1,98
EAA	0,17	0,79	0,09	0,21	0,03	0,07	0,06	0,17	0,03	0,05	0,27	0,15
EAA/TAA	0,17	0,41	0,25	0,13	0,13	0,14	0,13	0,10	0,08	0,11	0,15	0,08

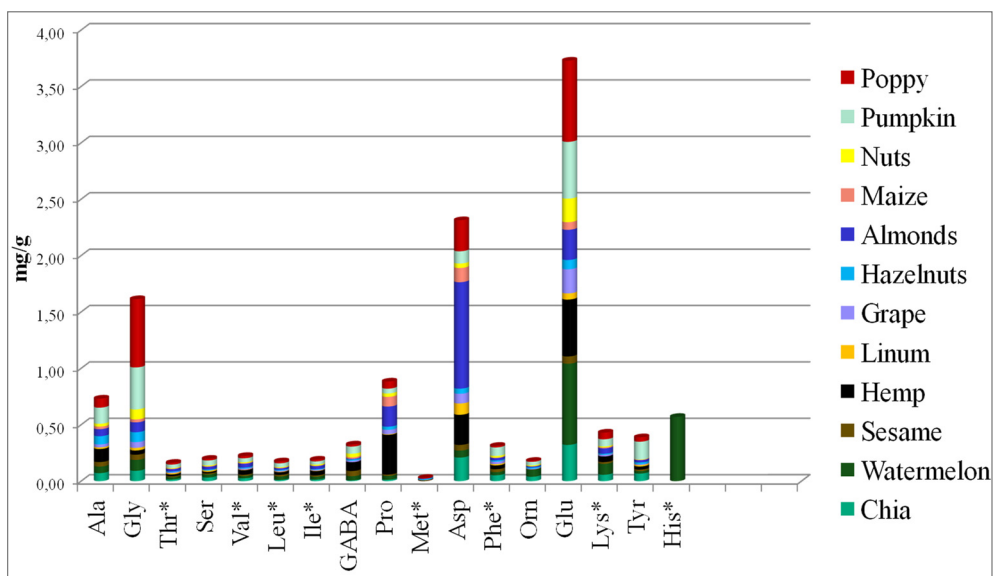


**Fig. 5.2.** Comparația aminoacizilor esențiali din diferite extracte de sămburi (mg/g)



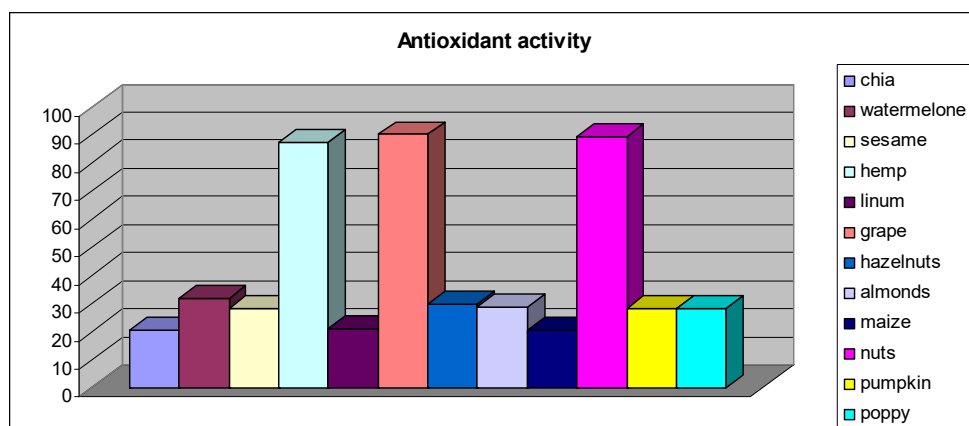
**Fig. 5.3.** Raportul aminoacizi esențiali/aminoacizi liberi totali în probe de sămburi





**Fig. 5.4.** Aminoacizii liberi (FAA) în probe de sâmburi. Aminoacizii esențiali sunt marcați (\*)

Toate extractele prezintă activitate antioxidantă. Cea mai mare activitate antioxidantă s-a dovedit a avea extractul de semințe de struguri, urmată de extract de nuci și cânepă, toate având o activitate antioxidantă comparabilă cu antioxidantii standard (Fig. 5.5).



**Fig. 5.5.** Activitatea antioxidantă a probelor de sâmburi studiate

Toate mineralele măsurate în semințe au fost prezente în cantități mari. Cea mai mare valoare pentru Ca a fost găsită în mac și semințele de struguri, iar în susan și chia a fost scăzut. Mg a arătat valori ridicate în toate semințele studiate, iar cea mai mare valoare a fost găsită în cânepă.

## 5.6. Concluzii

Metoda de diluție izotopică dezvoltată s-a dovedit a fi precisă și simplă, utilă pentru studii de caracterizare a diferitelor extracte de semințe studiate. Metoda poate servi la diferențierea între semințe utilizate ca suplimente nutritive. Valoare semnificativă pentru aminoacizii esențiali s-a obținut în cazul semințelor de pepene verde (datorită valorii ridicate a histidinei) urmată de cânepă, dovleac, migdale, mac și semințe de struguri. Cea mai mare activitate antioxidantă s-a dovedit a avea semințele de struguri, de nuci și de cânepă. Valoarea nutrițională exprimată prin conținutul de aminoacizi și proprietățile antioxidante a demonstrat calitatea acestora de a fi utilizate ca suplimente nutritive. Studiul a stabilit variația aminoacizilor liberi în diferitele probe asociate cu capacitatea lor antioxidantă.



## Capitolul VI

# Analiza prin GC-MS și diluție izotopică a aminoacizilor din plante

### 6.1. Efectele benefice ale extractelor din plante asupra organismului uman

Cunoscut pentru calitățile sale de aromatizare a mâncării, **chimenul** prezintă calități terapeutice multiple. Semințele de chimen sunt bogate în elemente nutritive, precum: minerale, vitamine, antioxidanți și o sursă bogată de fibre dietetice. 100 g de semințe furnizează 38 g de fibre, 100 % din aportul zilnic necesar. Ajută la prevenirea constipației, timpul de tranzit descrescând considerabil. Conține antioxidanții luteină și caroten cu rol în eliminarea radicalilor liberi din organism, protejand de cancer, infecții, îmbatrânire și boli neurologice degenerative. Conține minerale: fier, cupru, calciu, potasiu, mangan, seleniu, zinc, magneziu. Cuprul și fierul sunt necesari pentru producția de celule roșii din sânge. Zincul este co-factor în enzime care reglează creșterea și dezvoltarea, generarea spermei, digestia și sinteza acizilor nucleici. Potasiul ajută la reglarea ritmului cardiac și a tensiunii arteriale. Sunt bogate în vitamine, precum: vitamina A, vitamina C, vitamina E și vitamine din complexul B [118].

**Socul** are efecte terapeutice prevenind diferite afecțiuni. Florile și fructele de soc se folosesc în tratarea herpesului, reumatism, bolile căilor respiratorii. Conține rutin, izocuericetin hiperozid, glicozide, taninuri, santine, pectine, uleiuri esențiale, vitamina C și săruri minerale.

**Păpădia** are proprietăți antiinflamatoare, având efect benefic în astm și boli inflamatorii. Frunzele conțin vitamina A (carotenoidul antioxidant –betacaroten). vitamina C care ajută la facilitarea absorbției de fier. Frunzele de păpădie conțin tot aminoacizii esențiali fiind o proteină completă.

**Tătănesa conține** principii active care favorizează cicatrizarea și regenerarea pielii și mucoaselor, sudarea fracturilor, remisia tumorilor maligne și benigne. Alantoina, cel mai important principiu activ al tătănesei, are efecte antiinflamatoare, antitumorale și favorizează regenerarea țesuturilor.

Rădăcina de ghimbir este bogată în **potasiu, zinc, calciu, cupru, magneziu**, vitaminele B6, C și D, **uleiuri esențiale** cu multiple proprietăți benefice ( **gingerol, cineol**,

**elemen, borneol, bisabolen, curcumen, phelladrene**) cu efect afrodisiac, este tonic, înlătură oboseala și toxinele acumulate în organism.

Fructele de **păducel** sunt bogate în flavonoizi, taninuri, colină, pectină, glucoză, fructoză, substanțe minerale și uleiuri grase, vitaminele B1 și C. având efecte benefice în tratarea diverselor afecțiuni.

**Rostopasca** conține alcaloizi, sparteină, vitamina C, ulei volatil, flavonoizi, saponide, săruri minerale, fiind recomandată în tratamentul multor afecțiuni: colici biliare, dischinezia biliară, acneea, eczele, enterocolitele, hepatitele acute și cronice. Este utilizată în tratamentul leucemiei.

**Cimbrisorul** este indicat în tratarea tusei convulsive, bronșitei, răgușelii și tusei astmaticilor. Din uleiul volatil pe care îl conține se prepară ceaiuri expectorante, care calmează spasmele căilor respiratorii.

**Artemisia** (pelinul) conține flavonoide, ulei esențial (tuion - cea mai importantă componentă a plantei, în exces este toxică, acizi fenolici, acidul ascorbic, vitamina B6 - piridoxina, utilă în funcționarea sistemului nervos, minerale - calciu, fier, fosfor, lactone, principii amare - uleiul eteric, cu proprietăți - dezinfectante, laxative, depurative, diuretice, antiinflamatoare, carminative, vermifuge, antihelmintice, stomahice, este tonic nervos, tonic digestiv, analgezic, narcotic, stimulează digestia, cicatrizant.

Frunzele de **rozmarin** conțin ulei eteric, tanin, saponozide (substanțe bioactive naturale de origine vegetale), acid ursolic (polifenol care ajută la arderea grăsimilor), acid oleanolic (puternic antioxidant), acid glicerol, vitamina C și săruri minerale [69].

**Urzicile** reprezintă o sursă de proteine, fier și alte minerale esențiale pentru organism. Urzicile sunt recomandate ca aliment pentru detoxifierea și regenerarea organismului. Conțin substanțe de natură proteică și glucidică, aminoacizi, vitaminele B2, K și C, polivitamina A, acid pantotenic, beta caroten, săruri de calciu, fier, siliciu, magneziu, potasiu, amine, cetone, steroli. Proprietățile antiinflamatorii sunt datorate prostaglandinelor [69].

**Busuiocul** (*Ocimum basilicum*), **menta** (*Mentha piperita*) și **salvia** (*Salvia officinalis*), aparțin familiei Lamiaceae, sunt plante medicinale și culinare, datorită aromelor și mirosurilor delicate. Busuiocul, unul dintre cele mai importante condimente folosite, s-a dovedit a avea activitate antioxidantă, antibacteriană și anti-diareică [70]. Este benefic pentru sănătate prin conținutul mare de **minerale** și **vitamine**. Are utilizare terapeutică prin conținutul de substanțe active (carminativă, galactogogă, antiinflamatoare, febrifugă, antifungică, diuretică etc.) cu *§\_\_beneficii asupra organismului,\_\_* § industrială (producția de cosmetice și medicamente) și în alimentație (condimentarea preparatelor culinare). Uleiul volatil din florile sale conține substanțele active ca: estragol (până la 80%), camfor, anelol și linalool. Semințele busuiocului conțin mucilagii, iar frunzele sale conțin taninuri și saponozide triterpenice. Conține: Ca 177 mg, Fe 3.17 mg, Mg 64 mg, P

56 mg, K 295 mg, Na 4 mg, Zn 0.81 mg, etc. Vitamina C, 18 mg, Vitamina A 5275 IU, Vitamina K 414.8 µg [93–95], antioxidanți care protejează organismul de radicalii liberi și reduc riscul îmbolnăvirii celulelor.

### **Principalele proprietati ale busuiocului:**

**1. Tonic pentru memorie.** Frunzele de busuioc acționează ca un tonic asupra celulelor nervoase și îmbunătățesc memoria. Uleiurile esențiale sunt rapid absorbite de toate celulele organismului, iar efectele sunt vizibile în special când este consumat constant.

**2. Îndepărtează febra și favorizează refacerea după răceli frecvente.** Preparatele din busuioc induc transpirația abundentă, în acest fel este reglată temperatura corporală modificată din pricina virozelor sezoniere.

**3. Expectorant eficient.** Busuiocul ajuta la fluidizarea secrețiilor bronșice și ajută la expectorarea acestora. Tincturile din busuioc și ceaiurile sunt eficiente în astfel de cazuri. Preparatele cu busuioc sunt eficiente și în tratarea simptomelor de astm bronic și bronșită cronică.

**4. Calmează durerile în gât.** Uleiurile esențiale din compoziția acestei plante regale acționează ca antiinflamator vegetal, de aceea preparatele cu busuioc sunt eficiente în calmarea durerilor de gât.

**5. Ameliorează tulburările respiratorii.** Afecțiunile respiratorii sunt calmate cu ajutorul preparatelor din busuioc. Decoctul din frunze de busuioc face minuni asupra aparatului respirator. Combinat cu radacina din ghimbir și mierea de albine, preparatul devine panaceu, ușor de consumat.

**6. Ajută la eliminarea pietrelor la rinichi.** Se recomandă amestecul din frunze concentrate de busuioc cu miere de albine. Preparatul consumat pentru 4–6 luni are efect tonifiant și depurativ asupra rinichilor. Pietrele existente își micșorează dimensiunea și sunt eliminate natural, prin tractul urinar.

**7. Busuiocul reduce nivelul colesterolului din sânge.** Fitonutrienții pe care îi conțin semințele și frunzele de busuioc ajută la alcanizarea și mineralizarea organismului și a vaselor sangvine. Preparatele cu busuioc ajută la vitaminizarea vaselor sangvine, astfel că organismul capătă forța necesară pentru a lupta împotriva colesterolului rău.

**8. Are proprietăți antibacteriene.** Uleiurile oferă protecție împotriva bacteriilor, împiedică înmulțirea germenilor situați la nivelul tubului digestiv al aparatului excretor. Luptă eficient împotriva germenilor: Staphylococcus, Enterococcus, Pseudomonas.

**9. Ajuta la înlăturarea stresului.** Aroma uleiului esențial și a frunzelor de busuioc sunt cunoscute ca fiind un bun agent anti-stres. Ajuta la relaxare musculară și nervoasă dar și la purificarea sângelui.

**10. Afrodisiac vegetal natural.** S-a dovedit că curele cu busuioc ajută la îmbunătățirea funcțiilor sexuale. Stimulează relaxarea organismului și ajută la creșterea virilității. În același timp acționează asupra centrilor nervoși și favorizează îmbunătățirea funcțiilor sexuale. [95].

**Menta** (*Mentha piperita*) are efecte antiinflamatoare, citotoxice și antioxidante [71]. **Menta** are un conținut foarte bogat în mentol răcorind și relaxând fizicul și mentalul. Este un bun antioxidant, antibacterial, antifugal, antispasmodic și antiviral. Potasiu, Calciu și Vitamina B conținute în frunzele Mentei îți vor oferi energie, putere de concentrare.

Compusii chimici din compoziția mentei, îi oferă plantei proprietăți antiinflamatoare, antibacteriene, spasmolitice, antiemetice, stimulatoare (pentru bilă), dezinfectante, astringente. Preparatele terapeutice cu menta sunt indicate în multiple afecțiuni: biliare, digestive, virale, boli diareice sau pentru tratarea inflamațiilor pielii.

## **Beneficiile mentei**

**1. Tratează rapid diareea acută neinfecțioasă.** Menta este cel mai cunoscut remediu pentru diaree. Ceaiurile de menta au efect astringent pe de o parte, pe de altă parte ameliorează crampele intestinale și stomacale specifice acestei afecțiuni.

**2. Ameliorează simptomele colonului iritabil.** Compusii activi din mentă acționează la nivelul mucoasei intestinale, regenerând-o. Acționează ca agent antiinflamator și emolient asupra stomacului și intestinelor, astfel că senzațiile neplăcute provocate de această afecțiune sunt eliminate.

**3. Acționează ca antiinflamator al căilor respiratorii.** Mentolul, unul dintre compuşii care se regăsesc în menta de grădină, are efecte antiinflamatoare asupra căilor respiratorii superioare. Favorizează decongestia nazală și îmbunătățește rapid respirația. Ceaiurile din mentă sunt remedii eficiente în cazurile de sinuzită și inflamații ale mucoasei nazale.

**4. Calmează durerile de cap și migrenele.** S-a demonstrat că uleiul de mentă are acțiune calmantă asemănătoare paracetamolului. Se pare că uleiul de mentă aplicat la nivelul frunții și a tâmplilor sub formă de masaj împiedică instalarea migrenelor.

**5. Ameliorează simptomele de greață și vomă.** Preparatele din mentă atenuează senzațiile de greață, acestea sunt recomandate în special în cazurile de indigestie, provocată de abuzul alimentar.

**6. Are efecte benefice asupra respirației,** oferind senzația de respirație proaspătă. Împiedică dezvoltarea bacteriilor la nivelul cavității bucale și previne apariția infecțiilor în această zonă. De asemenea tratează afecțiunile gingivale. [68–69].

**Salvia** (*Salvia officinalis*), având o aromă deosebită, este folosită ca și condiment alături de cimbru, piper. Studiile despre salvie au demonstrat rolul acesteia pentru sănătate, îmbunătățirea memoriei, atenției, funcției cognitive, îmbunătățită și funcția comportamentală [72–74]. Poate fi utilizată, de asemenea, pentru tratarea tulburărilor digestive. Frunzele de salvie conțin un ulei volatil reprezentat prin substanțe terpenice, tuionă, tuiol, salven, sabinol. Frunzele mai conțin taninuri, principii amare, vitamina B1, C, săruri de potasiu, glicozide, polifenoli și rășini.

Combinăția dintre utilizările culinare și impactul său incontestabil asupra medicinei face ca salvia să fie foarte valoroasă pentru sănătatea umană.

### **Beneficiile pentru sănătate ale salviei**

**1. Îmbunătățește memoria:** cantități mici de salvie, indiferent dacă sunt inhalate sau consumate, pot spori abilitățile creierului.

**2. Tratează inflamațiile:** măcinarea frunzelor de salvie nu este întotdeauna cea mai plăcută soluție, deoarece aroma poate fi destul de intensă, dar acesta este cel mai eficient mod de a obține compușii organici care acționează în sistem. Tinctura sau ceaiul pot fi utile dacă suferiți de probleme inflamatorii, în special în tractul respirator sau gastro-intestinal, puteți elimina această inflamație cu acest preparat de salvie. Calitățile antiinflamatoare ale salvei se extind asupra problemelor de sănătate, cum ar fi artrita și guta, precum și inflamația generală a sistemului cardiovascular. Aceste inflamații care pot duce la boli de inimă și tensiune arterială ridicată. Flavonoidele și compușii fenolici găsiți în el sunt responsabili pentru aceste efecte benefice.

**3. Proprietăți antioxidante:** Compușii antioxidanți găsiți în salvie, cum ar fi acidul rosmarinic, luteolinul și apigeninul, pot lucra pentru a neutraliza radicalii liberi.

**4. Previne boala Alzheimer:** salvia are capacitatea de a stimula funcția creierului pentru a îmbunătăți memoria și concentrarea.

**5. Întărește sistemul imunitar:** Există câteva proprietăți antimicrobiene care au fost identificate în salvie. De obicei, consumate în cantități mici, puteți crea o aplicație de salvie și să o utilizați pentru a preveni infecțiile bacteriene și virale care atacă corpul prin piele.

**6. Îmbunătățește sănătatea osoasă:** Unul dintre beneficiile cele mai trecute de salvie este de fapt nivelul său superior de vitamina K, o vitamină esențială pentru organism, care nu se găsește în multe alimente. Vitamina K este un element crucial în dezvoltarea densității osoase și asigurarea integrității oaselor noastre pe măsură ce îmbătrânim. Adăugarea de frunze de salvie în dietă poate crește semnificativ nivelul vitaminei K, deoarece o singură porție are 27% din doza zilnică recomandată.



**7. Îngrijirea pielii:** este eficientă împotriva anumitor afecțiuni ale pielii, inclusiv eczemă, psoriazis și acnee. Aceste pete inestetice pot fi repede reglate și aspectul lor poate fi redus treptat, dacă aplicați în mod regulat extracte salvie pe zonele inflamate sau afectate.

**8. Gestionează diabetul:** conține anumite extracte și substanțe chimice care imită medicamentele prescrise în mod obișnuit pentru tratarea diabetului. Reglează și inhibă eliberarea glucozei stocate în ficat, prevenind fluctuațiile majore ale zahărului din sânge. [95].

Plantele medicinale sunt adesea folosite ca și condimente, ceai sau în extracte farmaceutice. Cele mai multe dintre acestea sunt investigate pentru valoarea lor nutritivă și proprietățile lor farmaceutice. Optimizarea micronutrienților în alimentație este foarte importantă. Aminoacizii joacă un rol important în nutriția umană. Nivelul aminoacizilor esențiali dictează valoarea lor nutritivă. Aminoacizii liberi au un efect important în aroma mâncării, influențează gustul său și contribuie la formarea de amine și compuși volatili. Acizii grași, omega-3 au efecte benefice în sănătate. Aminoacizii, acizi grași și compoziția chimică calitativă a plantelor poate fi influențată de mediu și condițiile geografice.

## 6.2. Obiectivul studiului

Plantele aromatice sunt utilizate pe scară largă în prepararea alimentelor și aromelor, parfumurilor, dar ele sunt, de asemenea, o bună sursă de aminoacizi.

**Chimen (caraway)**, Busuioc (*Ocimum basilicum*), Soc (Elderberry flower), Păpădie (Dandelion), Tătăneasa (Comfrey), Ghimbir (Ginger), Păducel (Howthorn), Lămâița (Lemon Verbena), Rostopasca (Celandine), Cimbrișor (Thyme), Artemisia (Artemisia), Menta (*Mentha piperita*), Curry (Curry), Salvie (*Salvia officinalis*), Rozmarin (Rosemary), Urzica (Nettle), care sunt utilizate în mod tradițional în medicină și hrană, au fost caracterizate și comparate în ceea ce privește extractele volatile, aminoacizii, capacitatea antioxidantă. Spectrometria de masă cuplată cu cromatografia de gaze (GC- MS) este o tehnică potrivită pentru caracterizarea compușilor din extractele de plante.

*Scopul investigațiilor* a fost de a determina diferențele dintre plantele achiziționate din România cu privire la aminoacizii prezenți în aceste plante folosite adesea ca ceai sau condimente.

De asemenea, au fost comparați și compușii lor volatili. Cuplajul spectrometrie de masă – cromatografia de gaz (GC-MS) este o tehnică adecvată pentru caracterizarea compușilor în extractele de plante. Pentru studiul prin această metodă, a fost necesar ca aminoacizii să fie derivatizați în componenți mai volatili, ca trifluoroacetil butil esterii. [75–80]

## 6.3. Materiale și metode

### 6.3.1. Reactivi și probe biologice

Plantele: **Chimen (caraway)**, Busuioc (*Ocimum basilicum*), Soc (Elderberry flower), Păpădie (Dandelion), Tătăneasa (Comfrey), Ghimbir (Ginger), Păducel (Howthorn), Lă-mâița (Lemon Verbenon), Rostopasca (Celandine), Cimbrișor (Thyme), Artemisia (Artemisia), Menta (*Mentha piperita*), Kurry (Curry), Salvia (*Salvia officinalis*), Rozmarin (Rosemary), Urzica (Nettle) au fost achiziționate de la Grădina Botanică din Târgu Mureș, România. Toți reactivii și standardele au fost achiziționate de la Merck (Darmstadt, Germania).

### 6.3.2. Extracția aminoacizilor din plante

**Pentru extracția aminoacizilor**, 100 mg de frunze din plante au fost extrase cu 1 ml de acid tricloroacetic 6% . Amestecul obținut a fost centrifugat timp de 5 minute la 6000 rpm și supernatantul a fost colectat pentru purificare. 0,5 ml din supernatant și 50  $\mu$ g [ $^{15}$ N] -glicină (standardul intern) s-au trecut peste o rășină schimbătoare de ioni (activată), coloană de 4  $\times$  40 mm Dowex 50W-W8. Soluția colectată a fost uscată într-un curent de azot la 60 °C.

### 6.3.3. Derivatizarea aminoacizilor

Metoda de derivatizare a inclus o esterificare a funcției carboxilice folosind 200  $\mu$ l butanol: clorură de acetyl (4: 1 v/v), timp de 1 oră la 110 °C, urmată de o acetilare a funcției aminice folosind 100  $\mu$ l de anhidridă trifluoracetică, timp de 20 minute la 80 °C.

**Pentru extracția substanțelor volatile**, 100 mg de frunze sfărâmate (mojarate) au fost sonicate și s-a extras cu 1 ml etanol la 60 °C timp de 15 minute, apoi s-a centrifugat timp de 3 minute. Amestecul a fost centrifugat la 5800 rpm și supernatantul colectat a fost filtrat și injectat în GC/MS și testat pentru activitate antioxidantă.

**Activitatea antioxidantă:** 100 mg plante mărunțite au fost extrase prin sonicare cu 1 mL etanol la 60 °C timp de 15 minute. Amestecul s-a centrifugat la 5800 rpm și supernatantul colectat s-a testat pentru activitatea antioxidantă prin metoda DPPH. 100 $\mu$ L (10mg/mL plantă) din fiecare extract s-a utilizat să decoloreze o soluție de 40 $\mu$ M DPPH.

## 6.4. Aparatura experimentală

S-a utilizat un spectrometrul de masă quadrupolar cuplat cu cromatograful de gaze Trace GC (DSQ Thermo Finnigan Proanalysis, Bucharest, Romania). Coloana cromatografică

capilară utilizată a fost Rtx-5MS, de lungime 30 m, diametru 0.25 mm, grosimea filmului fazei solide 0.25  $\mu\text{m}$ , faza solidă fiind 5% fenil metilpolisiloxan.

În cazul separării aminoacizilor s-a utilizat programul de temperatură: de la 70 °C, 2 min, 5 °C/min la 110 °C, 10 °C/min la 290 °C, apoi 16 °C/min la 300 °C. [1].

Programul de temperatură pentru FAME și separarea volatilor a fost: 50 °C timp de 2 minute cu o creștere cu viteza de 8 °C/min la 310 °C, timp de 8 minute.

Heliul a fost utilizat ca gaz purtător la un debit de 1 ml/min. S-a injectat 1  $\mu\text{l}$  din fiecare proba în GC-MS utilizând modul de spitare (10: 1). Injectarea s-a făcut cu auto-sampler-ul TriPlus (Proanalysis, București, România). Spectrometrul de masă a fost operat în modul EI, la 70 eV, curentul de emisie a fost de 100  $\mu\text{A}$  și spectrele de masă s-a înregistrat în intervalul de masă 50–500 a.m.u. Temperatura liniei de transfer s-a menținut la 250 °C, injectorul la 250 °C și sursa de ioni la 250 °C. Activitatea antioxidantă a fost determinată utilizând Spectrofotometru Varian Cary 50.

## 6.5. Rezultate și discuții

Am determinat și am comparat conținutul de substanțe volatile, aminoacizii și activitatea antioxidantă în plante medicinale: **chimen**, busuioc, soc, pădărie, tătăneasă, ghimbir, păducel, lămâiță, rostopască, cimbrisor, artemisia, mentă, curry, salvie, rozmarin, urzică. Pentru caracterizarea compușilor extrași din plante s-au utilizat metode de extracție, purificare prin tehnica schimbului de ioni în cazul aminoacizilor, etapele de derivatizare și analiză prin cromatografie de gaze-spectrometrie de masă (GC-MS).

Pentru analiza aminoacizilor, metodele au fost validate injectând soluții standard de aminoacizi. Probele au urmărit aceeași procedură de derivatizare ca și standardele. S-au obținut valori bune pentru liniaritate, precizie și limită de detecție [75].

Validarea metodei de analiză cantitativă a dat valori bune pentru liniaritate. Dreapta de regresie s-a obținut utilizând probe etalon de aminoacizi cu concentrație cunoscută din fiecare aminoacid, în intervalul 0–100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  și prin adăugarea aceleiași cantități de standard intern (50  $\mu\text{g/ml}$ ). Standardul intern utilizat a fost  $^{15}\text{N}$ -glicină (99 atom%  $^{15}\text{N}$ ). Corecția glicinei s-a făcut prin deconvoluție și calculul matricial. Abundențele fracțiilor izotopice pentru glicina naturală și izotopomer au fost obținute experimental [77,78] (Tabelul 1).

**Tabelul 6.1.** Matricea designe (stânga)  
și matricea pseudoinversă (dreapta) pentru calculul Gly[78]

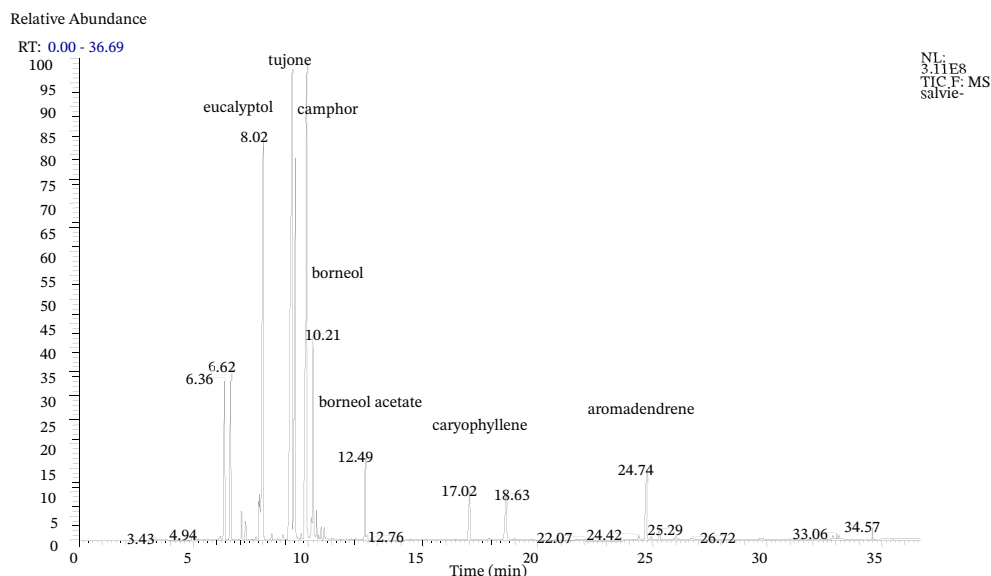
Glycina	[M]	[M + 1]	Glycina	[M]	[M + 1]
n.a.	0.95	0.05	n.a.	1.05	−0.05
$^{15}\text{N}$	0.01	0.99	$^{15}\text{N}$	−0.01	1.01

Glicina a fost calculată prin calcul matricial și cu dreapta de regresie. Precizia și acuratețea pentru glicină, măsurată pentru standardele de 20 și 30  $\mu\text{g/ml}$  ( $n = 7$ ) au dat rezultate foarte bune, mai mici de 6% și respectiv 11%. Validarea metodelor, utilizând standardele de aminoacizi după extracție și procedura de derivatizare ( $n = 3$ ), au dat rezultate bune. Dreptele de regresie pentru fiecare standard de aminoacid au fost studiate între 0 și 150  $\mu\text{g/ml}$  și a fost adăugată aceeași cantitate de standard intern. S-au determinat rezultate bune pentru liniaritate pentru aminoacizi, coeficientul de regresie  $r$  fiind de peste 0,99 pentru Ala, Gly, Thr, Ser, Leu, Ile, Pro, Orn și mai mare decât 0,97 pentru cealaltă etaloane. Precizia și acuratețea au fost mai mici de 20%, pentru etaloanele de 60 și respectiv 80  $\mu\text{g/ml}$ . Limita de detecție (LOD) a fost de ordinul  $\text{ng}/\mu\text{l}$ .

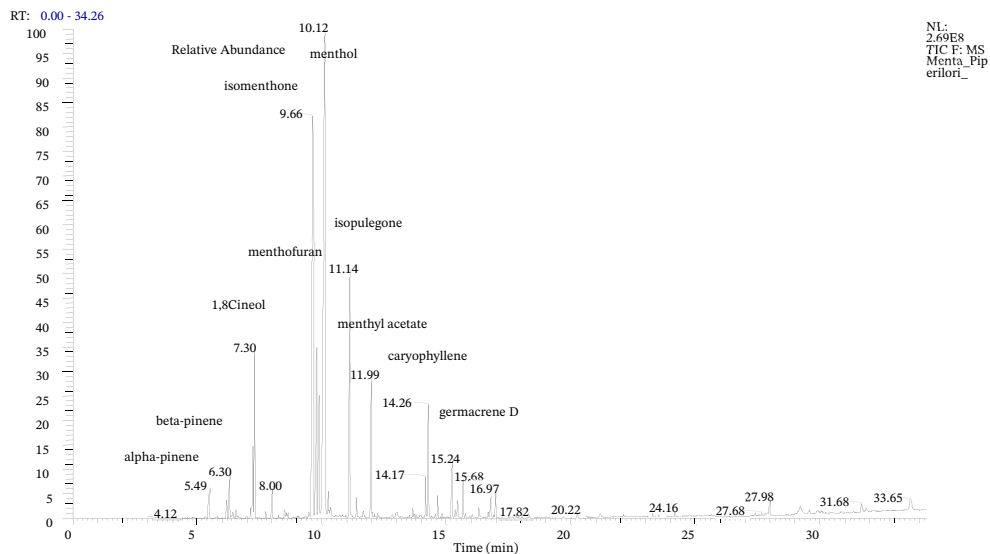
Extracțele volatile de busuioc au dat ca principalii compuși: linalool (26,13%), estragol (21,16%), cariofilină (10,13%) și limonen (8,18%).

Salvia a dat ca principalii compuși: -thujonă (25,08%), camfor (20,46%), eucaliptol (13,85%) și -thujonă (13,37%) (Fig. 6.1).

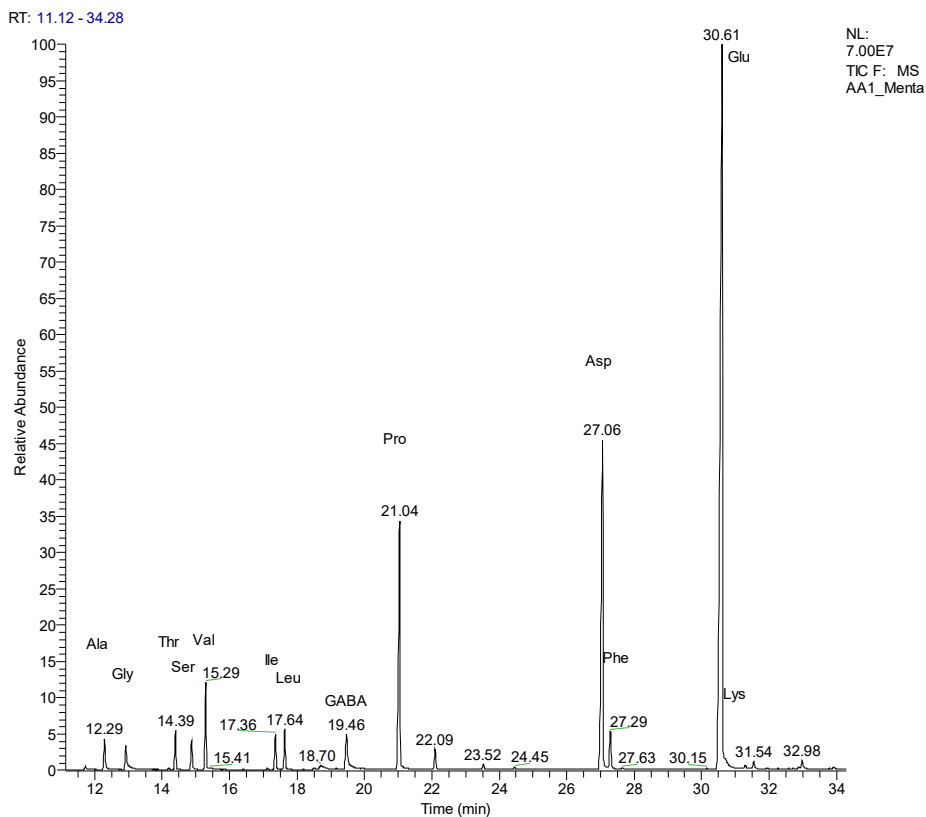
În mentă, compușii importanți au fost mentol (37,7%), izomenton (15,97%), eucaliptol (5,44%) și mentofuran (4,8%) (fig. 6.2).



**Fig. 6.1.** Identificarea volatilelor de salvie separate pe o coloană capilară Rtx-5MS



**Fig. 6.2.** Cromatograma volatilelor identificate în extractul de mentă



**Fig. 6.3.** Separarea și identificarea GC-MS a aminoacizilor prezenți în extractul de menta

Figura 6.3. prezintă cromatograma totală de ioni (TIC) separarea aminoacizilor și identificarea acestora din extractul de mentă. Biblioteca NIST a fost utilizată pentru identificarea compușilor.

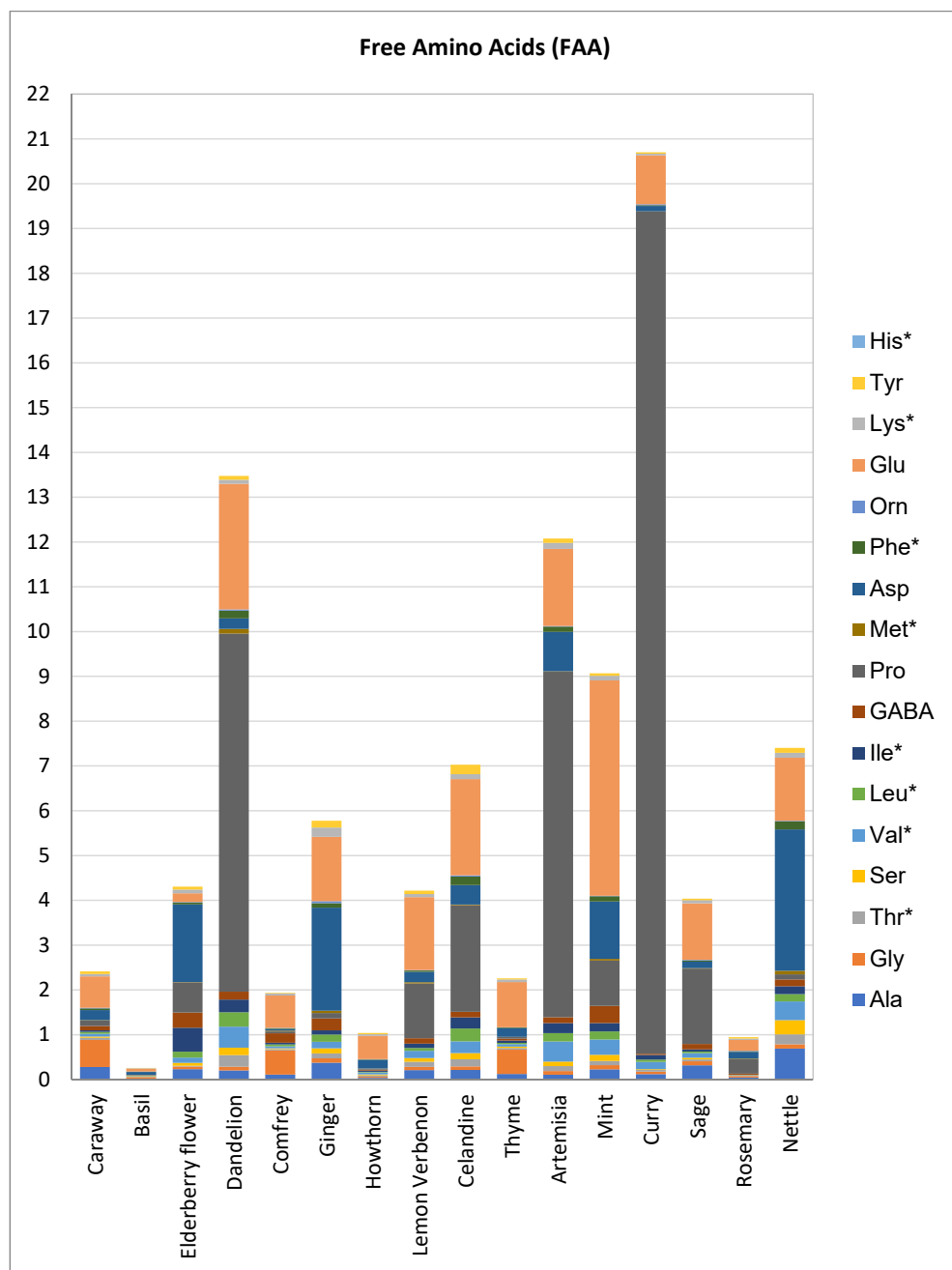
Ordinea de eluție a fost: alanina (Ala), glicina (Gly), treonina (Thr), serină (Ser), valină (Val), leucină (Leu), izoleucină (Ile), acid aminobutiric (GABA), prolină (Pro), metionină (Met), acid aspartic (Asp), fenilalanină (Phe), ornitină (Orn), acid glutamic (Glu), lizină (Lys), tirozină (Tyr).

Aminoacizii dominanți identificați în plantele studiate au fost prolina (în mg/g, în Curry (18.8), Artemisia (8.00)), acid glutamic (Menta (4.81), Păpădie (2.81), Tătăneasă (2.15)), acid aspartic (Urzică (3.16), Ghimbir, Soc (1.72), Mentă (1.28)), lisina, (Ghimbir (0.21), Artemisia (0.14)), glicina (Chimen (0.60), Tătăneasă (0.54), Cimbrișor (0.54)) și alanine (Urzică (0.69), Ghimbir (0.37), Chimen (0.38)). Cele mai mari valori pentru aminoacizii liberi totali s-au observat în curry, artemisia, mentă, urzică, rostopască (>7mg/g). Aminoacizii esențiali au variat de la 0,05 mg/g în Busuioc la 1,70 mg/g în Păpădie (Fig. 6.4).

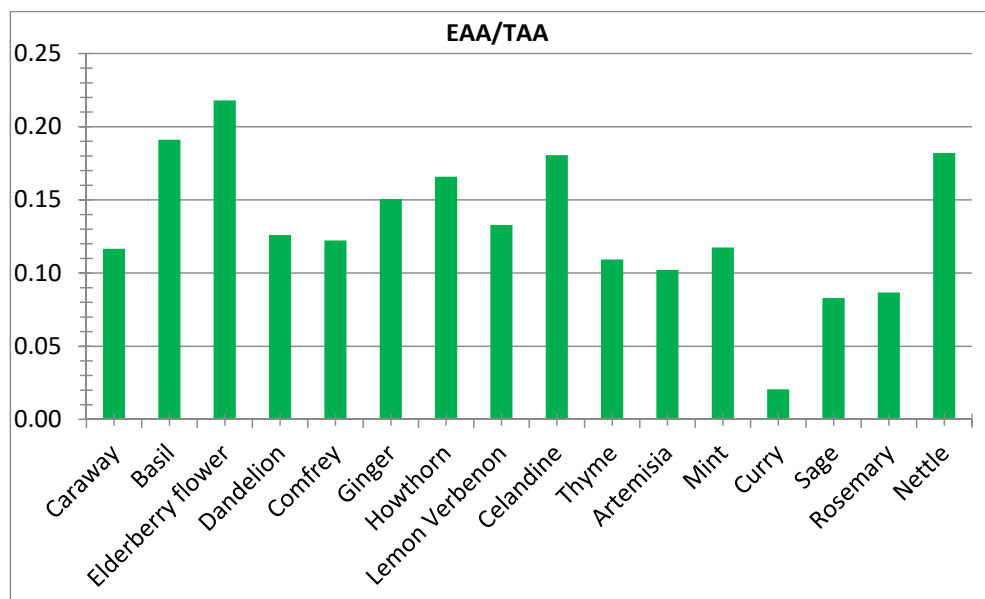
Valori semnificative ale aminoacizilor esențiali (EAA), în mg/g, s-au obținut în cazul Păpădiei (1.70) urmată de Urzică (1.35), Rostopască (1.27), Artemisia (1.23), Mentă (1.07), Soc (0.94), Ghimbir (0.87) și Lămâiță (0.56). Raportul EAA/TAA a fost mare în cazul florilor de Soc (0.22), urmate de Busuioc (0.19), Rostopască (0.18), Urzică (0.18), Păducel (0.17), Ghimbir (0.15), și în Curry (0.02) fiind cel mai mic.

Aminoacizii totali (FAA), au variat de la Curry (20.70) la Păpădie (13.47), Artemisia (12.08), Mentă (9.07), Urzică (7.40), Rostopască (7.03), Ghimbir (5.78), flori de Soc (4.30), Lămâiță (4.21), Salvia (4.03), Chimen (2.41), Cimbrișor (2.26), Tătăneasă (1.93), Păducel (1.04), Rosemarin (0.94) și Busuioc (0.26).

Metoda s-a dovedit potrivită și relativ simplă cu posibilitate de a fi aplicată la analiza aminoacizilor totali și poate să ajute la comparația între plante. Studiile comparative ajută de asemenea în studii de nutriție. Se poate recunoaște relația între dietă și starea de sănătate sau de boală. Necesarul de proteine și aminoacizi în nutriția umană este un subiect de mare interes. Studii recente au arătat că dieta bogată în care roșie și procesată este asociată cu indici crescuți de cancer de colon iar consumul de vegetale și fructe reduce riscul de cancer pulmonar. Vegetarienii comparați cu ne-vegetarienii cu același stil de viață, mortalitatea din cauza bolilor de inimă a fost cu 24% mai mică față de ne-vegetarieni [127].

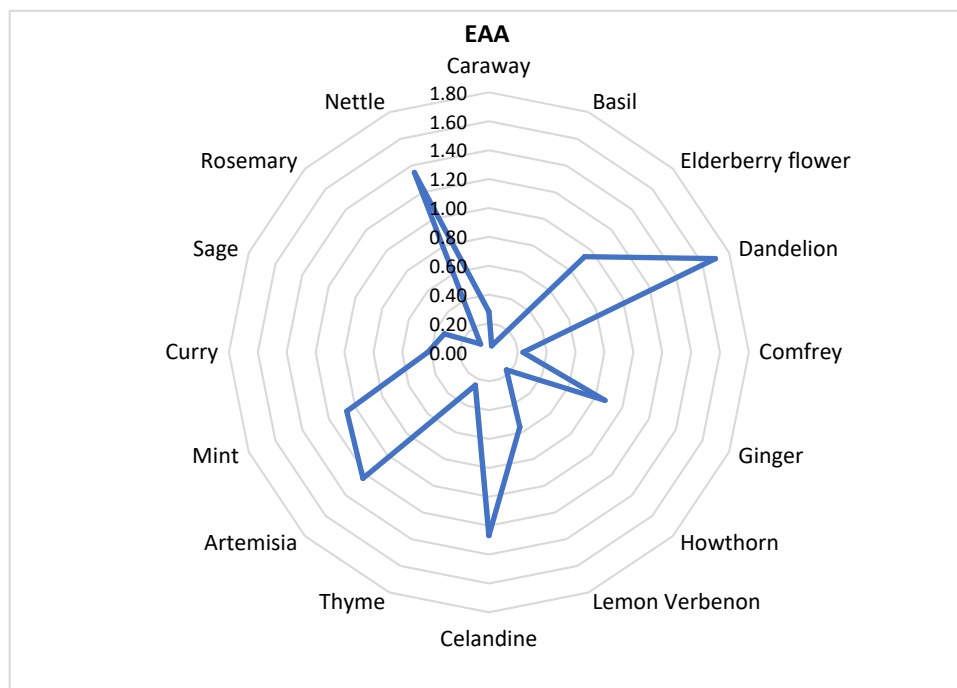


**Fig. 6.4.** Compararea aminoacizilor liberi în extractele de Chimen (Caraway), Busuioc (*Ocimum basilicum*), Soc (Elderberry flower), Papadie (Dandelion), Tataneasa (Comfrey), Ghimbir (Ginger), Paducel (Hawthorn), Lamaita (Lemon Verbena), Rostopasca (Celandine), Cimbrisor (Thyme), Artemisia (Artemisia), Menta (*Mentha piperita*), Kurry (Curry), Salvie (*Salvia officinalis*), Rozmarin (Rosemary), Urzica (Nettle) (mg/g). Aminoacizii esențiali sunt marcați (\*)



**Fig. 6.5.** Raportul aminoacizi esențiali/aminoacizi liberi totali găsiți în plantele analizate

Figura 6.5. prezintă raportul EAA/TAA (aminoacizi esențiali/aminoacizi totali) care este mai mare în soc, busuioc, urmat de rostopască și urzică.



**Fig. 6.6.** Comparația aminoacizilor liberi esențiali din diferite plante (mg/g)



Aminoacizii esențiali au fost mari în Urzică, urmați de Păpădie, Rostopască, Artemisia, Mentă, Soc, Ghimbir, Lămâiță, Salvie, Chimen, Busuioc.

**Tabel 6.2.** Valorile aminoacizilor, în mg/g, în plantele analizate

Herbs	Caraway	Basil	Elderberry flower	Dandelion	Comfrey	Ginger	Howthorn	Lemon Verbenon
	Chimen	Busuioc	Soc	Papadie	Tătăneasă	Ghimbir	Paducel	Lămâiță
AA	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g
Ala	0,28	0,02	0,23	0,20	0,11	0,37	0,03	0,21
Gly	0,60	0,03	0,06	0,08	0,54	0,10	0,03	0,07
Thr*	0,05	0,005	0,02	0,26	0,03	0,11	0,03	0,11
Ser	0,03	0,01	0,07	0,17	0,02	0,11	0,02	0,09
Val*	0,06	0,01	0,12	0,47	0,04	0,15	0,05	0,16
Leu*	0,04	0,01	0,13	0,32	0,04	0,16	0,01	0,06
Ile*	0,04	0,01	0,54	0,28	0,04	0,09	0,03	0,10
GABA	0,10	0,01	0,34	0,17	0,21	0,26	0,02	0,12
Pro	0,12	0,01	0,67	8,00	0,04	0,12	0,02	1,22
Met*	0,01	0,001	0,01	0,10	0,02	0,05	0,01	0,03
Asp	0,23	0,06	1,73	0,24	0,04	2,30	0,20	0,23
Phe*	0,04	0,01	0,05	0,17	0,02	0,10	0,01	0,03
Orn	0,01	0,01	0,01	0,03	0,01	0,05	0,01	0,01
Glu	0,70	0,06	0,19	2,81	0,72	1,44	0,52	1,63
Lys*	0,05	0,01	0,08	0,09	0,04	0,21	0,04	0,07
Tyr	0,06	0,01	0,06	0,09	0,01	0,15	0,03	0,07
His*								
Herbs	Celandine	Thyme	Artemisia	Mint	Curry	Sage	Rosemary	Nettle
	Rostopască	Cimbrisor	Artemisia	Menta	Kurry	Salvie	Rozmarin	Urzică
AA	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g
Ala	0,21	0,12	0,10	0,22	0,12	0,32	0,04	0,69
Gly	0,08	0,54	0,08	0,09	0,05	0,09	0,04	0,10
Thr*	0,16	0,04	0,11	0,09	0,04	0,04	0,01	0,22
Ser	0,14	0,03	0,10	0,14	0,02	0,04	0,01	0,32
Val*	0,26	0,06	0,45	0,34	0,16	0,10	0,01	0,42
Leu*	0,28	0,03	0,19	0,18	0,05	0,04	0,00	0,16
Ile*	0,25	0,05	0,22	0,19	0,10	0,05	0,00	0,18
GABA	0,13	0,04	0,13	0,38	0,03	0,12	0,03	0,15

<b>Pro</b>	2,38	0,04	7,71	1,01	18,80	1,68	0,32	0,11
<b>Met*</b>	0,01	0,00	0,01	0,04	0,01	0,01	0,01	0,08
<b>Asp</b>	0,44	0,19	0,88	1,28	0,12	0,15	0,15	3,16
<b>Phe*</b>	0,19	0,02	0,12	0,12	0,02	0,03	0,01	0,18
<b>Orn</b>	0,03	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01
<b>Glu</b>	2,15	1,01	1,72	4,81	1,09	1,26	0,24	1,41
<b>Lys*</b>	0,11	0,06	0,14	0,10	0,04	0,07	0,03	0,11
<b>Tyr</b>	0,21	0,03	0,10	0,06	0,03	0,04	0,03	0,11
<b>His*</b>								

**Tabel 6.3.** Cantitatea de aminoacizi totali și aminoacizi esențiali întâlniți și raportul acestora

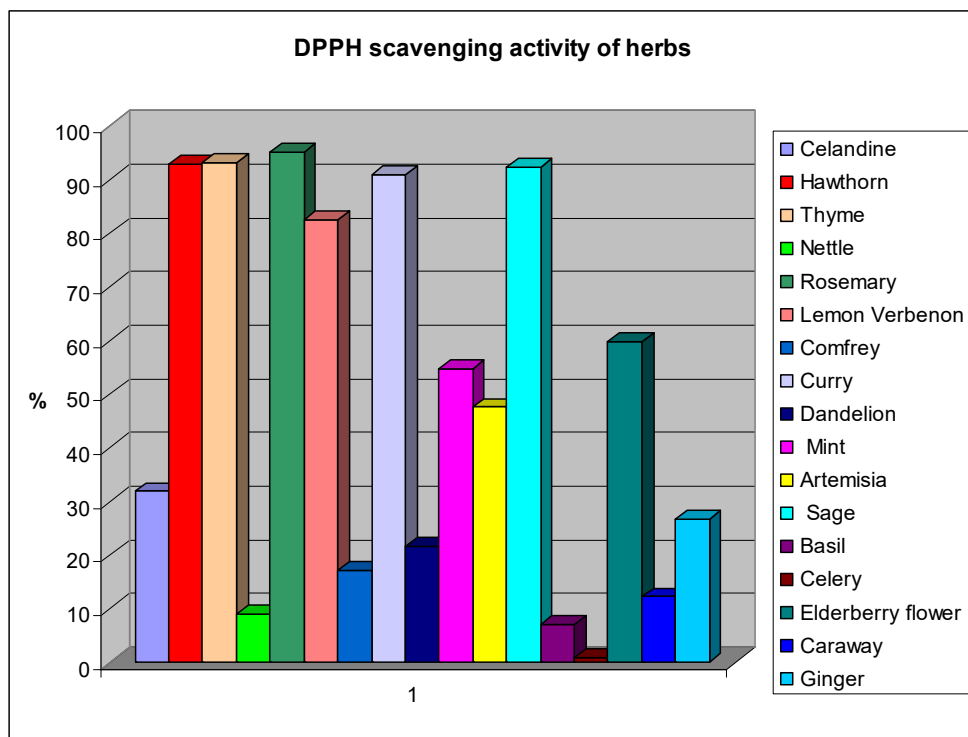
<b>Herbs</b>	<b>Caraway</b>	<b>Basil</b>	<b>Elderberry flower</b>	<b>Dandelion</b>	<b>Comfrey</b>	<b>Ginger</b>	<b>Howthorn</b>	<b>Lemon Verbenon</b>
	<b>Chimen</b>	<b>Busuioc</b>	<b>Soc</b>	<b>Papadie</b>	<b>Tătăneasă</b>	<b>Ghimbir</b>	<b>Paducel</b>	<b>Lămâiță</b>
TAA	2,41	0,26	4,30	13,47	1,93	5,78	1,04	4,21
EAA	0,28	0,05	0,94	1,70	0,24	0,87	0,17	0,56
EAA/TAA	0,12	0,19	0,22	0,13	0,12	0,15	0,17	0,13
<b>Herbs</b>	<b>Celandine</b>	<b>Thyme</b>	<b>Artemisia</b>	<b>Mint</b>	<b>Curry</b>	<b>Sage</b>	<b>Rosemary</b>	<b>Nettle</b>
	<b>Rostopască</b>	<b>Cimbrișor</b>	<b>Artemisia</b>	<b>Menta</b>	<b>Kurry</b>	<b>Salvie</b>	<b>Rozmarin</b>	<b>Urzică</b>
TAA	7,03	2,26	12,08	9,07	20,70	4,03	0,94	7,40
EAA	1,27	0,25	1,23	1,07	0,42	0,33	0,08	1,35
EAA/TAA	0,18	0,11	0,10	0,12	0,02	0,08	0,09	0,18

Activitatea antioxidantă a fost determinată utilizând metoda DPPH (bazată pe decolorarea radicalului 2,2-difenil-picril-hidrazil colorat în roșu purpuriu și având absorbția la 515 nm de către substanțe cu caracter antioxidant). Toate extractele de plante au prezentat activitate antioxidantă. Cea mai mare, peste 90%, a avut-o Rozmarinul, urmat de Cimbrișor, Păducel, Salvie, Curri. Urzica a avut activitate antioxidantă sub 10%.

Concentrația maximă efectivă la jumătate (EC50) pentru fiecare tip de extract a fost la salvie (EC50 = 8,22  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), urmată de extractul de mentă EC50 = 13,65  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  și extractul de busuioc EC50 = 112,58  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Activitatea antioxidantă la 50  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  din fiecare extract de plante, după 30 minute, a dat cea mai mare valoare în extractul de salvie (92,26%) urmat de cel de mentă (88,66%) și extractul de busuioc (24,28%). Comparând activitatea antioxidantă a acestor trei extracte de plante cu extracte de plante din alte surse geografice, au arătat că am obținut rezultate similare. Extractul de salvie din Târgu Mureș, (92,26%), s-a dovedit a avea o activitate comparabilă cu altele (85,12%)

[87], dar mai mare decât extractul metanolic din Tunisia. ( $EC_{50} = 29,33 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) [88]. *Mentha piperita* din regiunea Târgu Mureș ( $EC_{50} = 13,65 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) prezintă o activitate ușor mai ridicată, apoi *Mentha piperita* din nord-estul Algeriei ( $EC_{50} = 17,00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) [89], în timp ce activitatea antioxidantă a extractelor etanolice de mentă (88,66%) a arătat activitate mai mare decât extractul de mentă în dietileter din Arabia Saudită (34,21%) [90].

$EC_{50}$  din extractul nostru etanolic de busuioc ( $EC_{50} = 112,58 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) a arătat o activitate comparabilă cu alte extracte etanolice din diferite surse din România ( $EC_{50} = 124,95 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) [91], în timp ce extractul de busuioc apos din Serbia ( $EC_{50} = 17,93 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) a prezentat o activitate mai puternică [92].



**Fig. 6.7.** Activitatea antioxidantă a extractelor din plante (**Chimen (caraway)**, Busuioc (*Ocimum basilicum*), Soc (Elderberry flower), Papadie (Dandelion), Tataneasa (Comfrey), Ghimbir (Ginger), Paducel (Hawthorn), Lamaita (Lemon Verbenon), Rostopasca (Celandine), Cimbrisor (Thyme), Artemisia (Artemisia), Menta (*Mentha piperita*), Kurry (Curry), Salvie (*Salvia officinalis*), Rozmarin (Rosemary), Urzica (Nettle))

## 6.6. Concluzii

Metoda GC-MS cu diluție izotopică este o tehnică adecvată pentru determinarea aminoacizilor extracțelor din plante. Parametrii de validare: liniaritatea, în intervalul de interes, coeficienții de corelație, precizia, au fost bune. Prin diluție izotopică, utilizând un standard intern marcat, precizia crește, se evită suprapunerea compușilor analizați. Metodele sunt utile pentru controlul nutrienților și controlul dietei. Compușii identificați în plantele studiate sunt caracteristici pentru mirosul sau aroma acestor plante.

Valori semnificative pentru aminoacizii liberi totali, peste 7 mg/g, s-au obținut pentru Curry, Păpădie, Artemisia, Mentă, Urzică și Rostopască. Pentru aminoacizii esențiali s-au obținut valori mari în cazul Păpădiei, urmată de Urzică, Rostopască, Artemisia, Mentă, flori de Soc, Ghimbir și Lămâiță. Aminoacizi dominanți identificați în plantele studiate au fost prolina, acidul glutamic, acidul aspartic, lisina, glicina și alanina. Cea mai mare activitate antioxidantă s-a obținut pentru extracțelor din Rozemarin, Cimbrisor, Păducel, Salvie și Curry.



## Capitolul VII

# Optimizarea diagnosticării din analize de sânge utilizând metode statistice (chemometrie)

### 7.1. Metode de chemometrie aplicate pentru analiza datelor clinice

Metodele spectroscopice sunt instrumente puternice folosite pentru diagnosticarea multor boli. De multe ori, în cercetare, rezultatul se datorează modificării unui singur parametru. În domenii ca chimia, biologie, medicina, mediu înconjurător, datele fiind complexe, e nevoie de metode de analiză și interpretare complexe. În studii de mediu înconjurător, medicină, farmacologie, dacă variabilele se modifică simultan e important să se utilizeze metode adecvate pentru număr mare de date. În prezent în domeniul biologiei, medicinei, mediului înconjurător există o preocupare continuă privind volumul de date, în vederea stabilirii unor decizii cât mai precise și exacte. Achiziția datelor implică obținerea informației și prelucrarea acestora. Prelucrarea seturilor mari de date și interpretarea lor se face prin metode computaționale, bazate pe teoria mulțimilor vagi (fuzzy) eficiente în clasificarea datelor din diferite domenii: biologie, medicină, farmacie, mediu înconjurător [96–99].

Analiza cluster este o tehnică de analiză multivariată de clasificare a datelor prin care este posibilă gruparea unor unități statistice astfel încât să fie minimizată distanța logică inerentă fiecărui grup și maximizată aceeași distanță între grupuri. Distanța logică este cuantificată prin intermediul unor măsurători de similaritate/disimilaritate definite între unitățile statistice. Analiza cluster (clase sau grupe sub forma cărora se structurează mulțimile) urmărește restângerea mulțimii de variabile dând clustere. Analiza cluster este o tehnică de clasificare a datelor. Analiza clusterelor are în vedere, în cadrul unor seturi de date, identificarea claselor, grupurilor sau grupărilor cu cele mai asemănătoare elemente posibile în cadrul aceleiași clase (variabilitatea minimă în cadrul clasei) și distinctă una față de cealaltă, dacă ele aparțin diferitelor clase (variabilitatea maximă între clase). Ca rezultat, **analiza clusterului ne permite să examinăm asemănările și diferențele dintre obiectele aparținând unui anumit grup** pentru a le grupa în clase distincte și omogene. Fiecare obiect din setul analizat este atribuit unei singure clase, iar setul de clase este un set discret și neordonabil. [96–100, 125].

Clusterizarea ierarhică este considerată un sistem de recunoaștere necontrolată; reprezintă o metodă de analiză cluster care urmărește construirea unei ierarhii de clustere. Strategiile pentru gruparea ierarhică se încadrează în general în două tipuri: similaritate/disimilaritate. Procesul de clasificare începe fără informații referitoare la numărul de clase și componența modulelor din aceste clase. În acest caz, clasele sunt construite concomitent cu numărul de module analizate, care este în continuă creștere; numărul de clase posibile poate fi determinat doar la sfârșitul procesului. Anumiți algoritmi de clasificare necontrolată, cum ar fi algoritmi de partiționare, implică a priori determinarea numărului de clase pentru împărțirea obiectelor analizate. Acest lucru nu înseamnă că numărul de clase este de fapt cunoscut, ci doar se presupune acest număr. Sistemele de recunoaștere necontrolată a datelor folosesc principiile, metodele, procedurile și tehnicile cunoscute în literatura de specialitate sub numele de tehnici de ierarhizare, clasificarea nesupervizată sau analiza clusterelor [96–100, 125]. Prin urmare, analiza clusterului încearcă să identifice, în datele originale, numărul de grupuri, clase sau clustere, pe baza similarității și disimilarității datelor [96–100, 125].

În medicină analiza cluster poate clasifica grupuri de pacienți cu simptome similare. Dendograma este reprezentarea grafică a datelor de corelare a componenților. Componenții individuali sunt aranjați la baza dendogramei și se grupează în noduri. Componenții cluster sunt formați prin gruparea componenților individuali sau clusteri la punctul de grupare numit nod. La fiecare nod al dendogramei avem sub-ramuri la dreapta sau stânga compuşilor cluster. Pe axa verticală e reprezentată distanța și se referă la distanța măsurată între componenți sau clusteri. Înălțimea nodului poate reprezenta valoarea distanței între sub-ramurile drepte și stângi ale clusterilor. Distanța între doi clusteri se calculează:  $D = 1 - C$  (unde  $D$  = distanța și  $C$  = corelația între compuşii clusterului) Dacă componenții sunt foarte corelați vor avea valoarea corelației apropiată de 1 și  $D = 1 - C$  va avea valori apropiate de zero. Deci clusterii corelați sunt cei mai apropiați de baza dendogramei iar cei necorelați vor avea  $C$  apropiat de zero și  $D$  apropiat de 1. Componenții corelați negativ arată comportare opusă, corelația fiind  $C = -1$  și  $D = 1 - (-1) = 2$ . Spre partea de sus a dendogramei componenții cluster devin mari, distanța între componenți crește și interpretarea distanței devine dificilă. Noi am reprezentat pe ordonată, pentru o bună vizualizare, valoarea  $(D_{leg}/D_{max}) * 100$ , așadar valorile mici arată corelația bună între componenți [126].

Analiza componentelor principale (PCA – Principal Component Analysis) este o tehnică care permite reducerea dimensiunii datelor, asigurând transformarea unui set de date corelate din spațiul cu  $n$  dimensiuni, într-un set de date necorelate în spațiul cu  $q$  dimensiuni ( $q \leq n$ ). Variabilele necorelate, numite componente principale, constituie combinații liniare ale mărimilor originale corelate (variabile initiale). PCA este un procedeu pentru procesarea, compresia și vizualizarea datelor.

## **7.2. Obiectivul studiului**

Scopul principal a fost efectuarea unui studiu chemometric al datelor clinice din rezultatele analitice prin utilizarea metodelor de analiză a clusterului și analiza componentelor principali (PCA). S-au utilizat tehnici spectrofotometrice pentru obținerea unei metode de identificare a bolii, prin analiza sângelui mai multor pacienți. S-au găsit modele de similitudine, atât între pacienți, cât și pentru testele clinice. Două metode clasice de chemometrie și anume Analiza Cluster (CA) și Analiza Componentelor Principali (PCA) au fost aplicate la evaluarea datelor clinice. Aceste metode au fost utilizate pentru a diferenția pacienții (cazurile) în funcție de sex și vârstă. Prin analiza componentelor principali s-a redus setul de date la câteva reprezentative, iar prin analiza clusterului s-au determinat diferențe și nepotriviri.

## **7.3. Materiale și metode**

### **7.3.1. Reactivi și probe biologice**

Subiecții de la care s-a făcut recoltarea sunt pacienți care s-au prezentat la Laboratorul de analize medicale în vederea recoltării probelor biologice pe baza trimiterii de către un medic specialist în vederea obținerii unor rezultate a unor parametri de interes pentru diagnosticarea unor afecțiuni sau pentru monitorizarea afecțiunilor de care suferă pacientul. Recoltarea materialului biologic, în cazul nostru, sânge, s-a făcut prin puncție venoasă. Probele au fost recoltate, în funcție de analizele cerute, în eprubete speciale de biochimie cu dop roșu (vacuette), fără aditiv sau anticoagulant. Scopul: permite coagularea probei și separarea serului. Serul trebuie separat în 45–60 min. de la puncția venoasă. După centrifugarea probelor se extrage serul și se analizează parametri solicitați. Probele pacienților au fost analizate cu un analizor automat de biochimie Konelab 30 prin metoda spectrofotometrică, reactivii folosiți fiind procurați de la firma Vitromed. Analizorul pipetează 200 - 300  $\mu$ l reactiv de lucru (cantitatea de reactiv necesară fiecărui test este specificată în prospectul reactivului) iar cantitatea de ser necesară este specificată în prospectul reactivului.

Pentru TGO (ASPARTAT-AMINOTRANSFERAZA (GOT/ASAT/AST)

Analizorul pipetează 300  $\mu$ l reactiv de lucru și 30  $\mu$ l ser nehemolizat și după un timp de incubare de 60 sec. la 37 °C citește variația DO (densitate optică)/minut la 340/600nm, proporțională cu activitatea enzimatică a aspartat aminotransferazei din ser.

TGP (ALANIN-AMINOTRANSFERAZĂ (GPT/ALAT/ALT)



Analizorul pipetează 300  $\mu$ l reactiv de lucru și 30  $\mu$ l ser nehemolizat și după un timp de incubare de 60 sec. la 37 °C citește variația DO/minut la 340/600nm, proporțională cu activitatea enzimatică a alanin aminotransferazei din ser.

**COLESTEROL:** Analizorul pipetează 300  $\mu$ l reactiv colesterol și 3  $\mu$ l de ser diluați cu 15  $\mu$ l apă neionizată, într-una din cuvele de reacție și, după un timp de incubare de 5 minute, citește DO (densitate optică) la 505/700 nm, față de blankul de reactiv.

**TRIGLICERIDE:** Analizorul pipetează 300  $\mu$ l reactiv colesterol și 3  $\mu$ l de ser diluați cu 15  $\mu$ l apă neionizată, într-una din cuvele de reacție și după un timp de incubare de 5 minute, citește DO(densitate optică) la 505/700 nm, față de blankul de reactiv.

**GLUCOZA:** Analizorul pipetează 300  $\mu$ l reactiv și 3  $\mu$ l de ser nehemolizat, într-una din cuvele de reacție și, după un timp de incubare de 5 minute la 37 °C, analizorul citește DO(densitate optică) la 505/700 nm față de blankul de reactiv.

**ACID URIC:** Analizorul pipetează 150  $\mu$ l reactiv  $R_1$  + 150  $\mu$ l reactiv  $R_2$  și 8  $\mu$ l de ser nehemolizat, într-una din cuvele de reacție ale analizorului. După un timp de incubare de 5 minute la 37 °C, analizorul citește DO (densitate optică) la 505/700 nm, față de blankul de reactiv.

**CALCIU:** Analizorul pipetează 250  $\mu$ l reactiv  $R$  + 250  $\mu$ l reactiv  $R_2$  și 5  $\mu$ l de ser, într-una din cuvele de reacție ale analizorului. După un timp de incubare de 5 minute la 37 °C, analizorul citește DO (densitate optică) la 505/700(550–590) nm, față de blankul de reactiv.

**FIER:** Analizorul pipetează 300  $\mu$ l reactiv  $R_1$  + 5  $\mu$ l reactiv  $R_2$  și 20  $\mu$ l de ser, într-una din cuvele de reacție ale analizorului. După un timp de incubare de 5 minute la 37 °C, analizorul citește DO (densitate optică) la 505/700(530–590) nm, față de blankul de reactiv.

**MAGNEZIU:** Analizorul pipetează 150  $\mu$ l reactiv  $R_1$  + 150  $\mu$ l reactiv  $R_2$  și 3  $\mu$ l de ser nehemolizat, într-una din cuvele de reacție ale analizorului. După un timp de incubare de 5 minute la 37 °C, analizorul citește DO (densitate optică) la 505/800 (500–520) nm, față de blankul de reactiv.

**CREATININA:** Analizorul pipetează 150  $\mu$ l reactiv  $R_1$  + 150  $\mu$ l reactiv  $R_2$  și 20  $\mu$ l de ser nehemolizat, într-una din cuvele de reacție ale analizorului. După un timp de incubare de 1 minut la 37 °C, analizorul citește  $DO_1$ , iar după exact 2 minute după prima citire se citește  $DO_2$  la aceeași lungime de undă 505/546 nm.

**UREEA:** Analizorul pipetează 200  $\mu$ l reactiv  $R_1$  + 30  $\mu$ l reactiv  $R_2$  și 3  $\mu$ l de ser nehemolizat, într-una din cuvele de reacție ale analizorului. După un timp de incubare de 1

minut la 37 °C, analizorul citește DO<sub>1</sub> la 340/700 nm, iar după exact 1 minut după prima citire se citește DO<sub>2</sub> la aceeași lungime de undă 340/700 nm.

## 7.4. Partea experimentală

### Studiul I

Au fost studiați un număr de 6 bărbați (M) și 30 de femei (F). A fost utilizată metoda spectrofotometrică, tipul de eșantion: ser. Datele clinice analitice sunt prezentate în tabelul 7.1. și tabelul 7.2.

Compușii investigați în probele de sânge uman au fost compuși organici de interes clinic (glucoză, colesterol, trigliceride, uree, creatinină, tabelul 7.1.), compuși anorganici (Ca, Mg și Fe), enzime (TGO, TGP-transaminaze) și VSH (viteza de sedimentare a hematiilor) (tabelul 7.2). Metodele chemometrice au fost utilizate pentru a diferenția pacienții (cazurile) în funcție de sex și vârstă [123].

**Tabel 7.1.** Datele clinice studiate (mg/dl) [123]

P	Sex	Age	Glu	Trigly	Creat	Chol	Urea
1	F	65	86.5	145	0.95	268	
2	M	65	91.5	136	0.95	165	
3	F	68		119		260	
4	F	14	97	62	0.65	145	25.1
5	F	81	109.6	116	0.83	160	
6	M	33	95	101	0.81	230	36.84
7	F	73	131.1	57	0.54	221	
8	M	69	98.5	73	1.07	207	
9	F	71	100	128	1.08	194	38
10	F	49	88	134	0.58	273	
11	F	54	92	117	0.78	250	
12	F	21	74	36	0.82	177	28.18
13	F	65	123	62	0.77	256	22.69
14	M	56	109	42	0.82	165	26.04
15	F	25	78	41	0.88		22.65
16	F	54	101	227	1.32	220	65.64

<b>P</b>	<b>Sex</b>	<b>Age</b>	<b>Glu</b>	<b>Trigly</b>	<b>Creat</b>	<b>Chol</b>	<b>Urea</b>
17	F	72	145	94	0.8	179	
18	F	74	84	57	0.71	230	
19	F	50	83	48	0.87	195	
20	F	53	82	69	0.84	293	
21	F	76		70	0.99	213	29.42
22	F	41	78	45	0.67	194	
23	M	61	84	92	0.93	170	27.87
24	F	49	95	125	0.84	168	29.67
25	F	27	81	73	0.86	175	18.95
26	F	29	72	49	0.82	142	14.85
27	F	87	101		1.1	187	
28	F	60	89	116	0.97	259	
29	F	54	94	124	0.82	201	39.11
30	F	12	83.1		0.41		42.44
31	F	58	310	225	1.22	266	
32	F	60	107	219	0.84	353	25.93
33	F	76	88.5	86	0.95	217	30.39
34	F	45	85	132	0.91	199	11.23
35	M	48	94	191	1.24	262	22
36	F	51	86	191	0.92	276	

Interval biologic de referinta: [121,123]

Glucoză (Glu): 60–110 mg/dl;

Colesterol (Chol): < 200 mg/dl; mare: > 240 mg/dl;

Trigliceride (triglic): bărbați (M): 40–160 mg/dl; femei (F): 36–135 mg/dl;

Uree: 10–50 mg/dl;

Creatinină (creat): bărbați: 0,9–1,3 mg/dl; femei: 0,6–1,1 mg/dl;

**Tabel 7.2.** Date clinice studiate (mg/dl) [123]

<b>P</b>	<b>Sex</b>	<b>TGO</b>	<b>VSH</b>	<b>Ac. uric</b>	<b>TGP</b>	<b>Ca</b>	<b>Fe</b>	<b>Mg</b>
1	F	27	13	5.49	19			
2	F	28	5		14		87	2.25
3	F	30			38			

<b>P</b>	<b>Sex</b>	<b>TGO</b>	<b>VSH</b>	<b>Ac. uric</b>	<b>TGP</b>	<b>Ca</b>	<b>Fe</b>	<b>Mg</b>
4	F	23		6.75	17			
5	F	36	10	3.77	44			
6	F	22	45		10	8.2	62	2.24
7	M	49	5		66			
8	F	24	6		26	9.57	94	2.35
9	F	44	9	4.09	64	9.54		
10	F	30	5	3.32	13	9.17	102	2.18
11	F	28			22			
12	M	37		3.32	38			
13	F	27		7.05	18		138	
14	F	25		4.66	27			
15	F	26	5	2.96	12			
16	F		5		16	8.94	108	2.25
17	F	33	19		7	8.93	95	2.29
18	F	12			33	9.45		
19	F	43			46	8.73		2.06
20	F	34	15	3.06	56	8.93		2.27
21	M	57	18	5.92	61		68	
22	M	29	11	6.34	24			
23	F	25			17	9.27		2.11
24	M	32			23		98	2.36
25	F	20			18			
26	F	36	16		23	8.1		2.4
27	F	27			18	9.31		2.29
28	F	23	13	4.11	16	8.63	74	2.19
29	M	53	5	11.12	70	9.49	123	2.32
30	F	27	8		10		79	2.29
31	F	11		3.52	19	8.7	70	2.11
32	F	28	12		22	8.25	87	2.3
33	F	27	6		16	8.35	69	2.31

P	Sex	TGO	VSH	Ac. uric	TGP	Ca	Fe	Mg
34	F	22	5	4.95	19	8.79	123	2.46
35	F	24	18		22	9.25		2.33
36	F	15	5	3.23	29	8.86	128	2.56

Interval biologic de referință: [121,123]

Acid uric: bărbați: 3,4–7,0 mg/dl; Femei: 2,4–5,7 mg/dl;

TGO: 0–35 U/l;

TGP: bărbați: 0–35 U/l; femei: 0–36 U/l;

VSH: 2–12 mm/h metoda Westergreen, tip eşantion: sânge integral K3 EDTA;

Calciu (Ca): 8,6–10,3 mg/dl;

Magneziu (Mg): 1,6–2,5 mg/dl;

Fier (Fe): copii: 50–120 mg/dl; femei: 60–160 mg/dL bărbați: 80–180 mg/dl.

### Un alt studiu (II):

Au mai fost studiați un număr de 27 bărbați (M) și 46 de femei (F), de vârste diferite la la care s-a luat în considerare diagnosticul pacientului și unele analize în plus față de studiul precedent, analize de hematologie: WBC ( Leucocitele), HGB ( Hemoglobina) și PLT (Trombocitele).

Datele clinice analitice sunt prezentate în tabelul 7.3. și tabelul 7.4. Compușii investigați în probele de sânge uman sunt de interes clinic (WBC,HGB,PLT,VSH, TGO,TGP, tabelul 7.3.), (Ca, Mg, Fe, Uree, Creat, Acid Uric, Glic, Col, Trig (tabelul 7.4). Metodele chemometrice au fost utilizate pentru a diferenția pacienții (cazurile) în funcție de sex și vârstă. Pacienții au fost separați în două grupe, în funcție de sex și în trei grupuri, în funcție de vârsta lor și trei componente principale.

**Tabel 7.3.** Date clinice studiate (mg/dl)

Nr.	Sex	Vârstă	Diagnostic	WBC	HGB	PLT	VSH	TGO	TGP
1	F	47	Tiroidită cronică autoimună. Hipotiroidie	7,19	14,4	352	16	12,9	12,4
2	M	48	Steatoză hepatică. HTA. Sindrom metabolic.	6,92	15,1	243	6	49	99
3	F	40	Mastopatie fibrochistică. Gușă difuză gr I B. SDR depresiv în observație	6,44	11,8	354	16	19	18
4	F	48	Dislipidemie mixtă. Sindrom climateric. Microadenom hipofizar nesecretant.	5,93	13,5	259	18	21	29

Nr.	Sex	Vârsta	Diagnostic	WBC	HGB	PLT	VSH	TGO	TGP
5	M	67	Cardiopatie ischemică. Diabet zaharat.	7,94	13,8	237	8,00	16,2	19,8
6	F	66	Nodul tiroidian	7,32	14,6	205	28	17,8	18
7	M	55	Dislipidemie. Toleranță scăzută la glucoză.	7,4	14,8	160		17,5	20,5
8	F	51	Dislipidemie mixtă.	7,94	12,7	286	6	20,2	12,4
9	M	40	HTA. Crize sincopale.	10,4	15,3	310		33	36
10	F	58	Gușă polinodulară. Hipotiroidie.	5,24	14,6	226		12	22
11	F	33	Colecistită acută	4,5	13	154	8	39,2	62,4
12	M	10	Scăderea toleranței la glucoza.	6,5	14,1	281	3	14	14
13	M	18	Sănătos	7,6	16	236		23	21
14	M	35	Calcul ureteral. Ureterohidronefroză	7,68	14,9	297		18	28
15	M	36	Dislipidemie	6,9	13,8	244			36
16	M	76	HTA forma medie. Aritmie.	7,6	15,3	194		26	39
17	M	44	Tiroidită cronică. Exces ponderal. Hipercolesteremie.	8,38	15,76	241		18	17
18	M	16	Colecistită acută	8,64	15,9	147		15	18
19	M	42	Dislipidemie mixtă. BPOC în observație	7,11	15,8	231	6	22	19
20	M	70	HTA forma medie. Dislipidemie.	9,1	17	2	211		28
21	F	11	Pneumonie bazală	9	14,08	304	36	16	14
22	F	42	Sănătos	6,17	13,8	212		16	20
23	F	66	Gușă multinodulară. Gastrită cronică.	5,84	14,6	203		20	32
24	F	69	Cardiopatie ischemică cronică. Angor de efort agravat. HTA II.		19	20			
25	F	71	Cardiopatie ischemică cronică. Angor de efort agravat. HTA II.	9,8	13,7	259	24	27	24
26	F	72	Cardiopatie ischemică. HTA	9,68	14,4	213			
27	F	76	HTA. Cardiopatie ischemică	10,72	13,8	178		30	33
28	F	41	Microadenom hipofizar. Dislipidemie mixtă.	6,24	14	224	38	22	22

Nr.	Sex	Vârsta	Diagnostic	WBC	HGB	PLT	VSH	TGO	TGP
29	F	42	Microadenom hipofizar. Dislipidemie mixtă.	8,4	12,9	225	12	17	20
30	F	44	microadenom hipofizar. Dislipidemie mixtă.	6,85	13,8	241		20	25
31	F	46	microadenom hipofizar. Dislipidemie mixtă.	7,36	14,6	280	14	20	16
32	M	58	Obezitate. HTA. Dislipidemie	7,6	14,9	260		16,45	23,87
33	M	3	Urticarie de etiologie necunoscută	6,7	12,1	384		35	35
34	F	67	Spondilopatii. HTA. Dislipidemie. Insomnie.	4,6	13,1	235	10	14,8	11,7
35	F	62	HTA	7,1	13,3	229		21,3	17
36	M	15	Acnee. Obezitate.	7,91	14,4	263		21	37
37	F	61	HTA. Glaucom	8,3	14,2	239	7	17,7	18,7
38	F	80	HTA. Nefropatie cronică. Ateroscleroza. Cardiopatie.	8,6	9,15	171		16	13
39.	M	62	Arteropatie. Discopatie	5,27	13,88	144			
40	M	64	HTA. Carcinom. Cataractă	5,55	13	183	50		
41	F	46	Sindrom poliuro-polidipsic. HTA. Obezitate gr. II.	10,6	14,83	248	18		
42	F	32	Hepatopatie în obs	5,75	13,7	213		16,83	36,31
43	M	67	HTA gr. III. Cardiopatie ischemică și hipertensivă. Dislipidemie. Adenom de prostată.	9,29	12,5	147		28	44
44	F	67	HTA. Dislipidemie. Disfuncția vezicii urinare.	6,6	13,7	172		15	9
45	F	57	Scolioză. Discopatie	6,35	29,6	227		14,7	11,3
46	F	43	Gastrită cronică nespecificată	7,2	12	246		18,7	11,8
47	F	48	HTA medie. Hipotiroidie. B. varicoasă.	9,64	12	227			18
48	F	45	Halux valgus drept. Metatarsalgie.	8,22	16	292	6	52	53
49	F	68	Boala Lyme. Gușă polinodulară.	3,9	12,3	229	13	23	18,6
50	F	49	Gușă polinodulară. Exces ponderal.	8,12	13	343		11	16

Nr.	Sex	Vârsta	Diagnostic	WBC	HGB	PLT	VSH	TGO	TGP
51	M	20	Sindrom autist. Psihoza grefată. Enurezis nocturn.	9,05	14,3	229			
52	F	62	Sănătos				14	19,2	10,8
53	M	62	HTA. Aritmie.	6,03	16,26	229	7	24,6	22,8
54	F	48	Sănătos	7,04	13,1	288	4	18	19
55	M	71	Neo gastric în observație	8,91	12,6	355		10	7
56	F	33	Sănătos	8,52	13,3	428		19	14
57	M	40	Hepatita B	6,5	16,7	385	8	19	54
58	F	38	Sănătos	5,51	29,9	233	1	22	30
59	F	36	Sarcina 33 săpt.	9,85	12,5	278		19	28
60	M	76	HTA. Dislipidemie. Nefropatie	7,48	14,7	192	15	30	33
61	F	46	Macroadenom hipofizar secretant. Diabet tip II. HTA	4,23	12,79	179	24	21	24
62	M	57	HTA. Dislipidemie.	5,04	14,2	211			32
63	M	65	B. Parkinson. Ateroscleroză cerebrală st. II. Cardiopatie ischemică. HTA.	7,57	15,7	229		18	26
64	F	61	Obezitate gr. II	7,24	13,7	228		46	25
65	F	67	HTA gr. II. Cardiopatie ischemică.	4,4	13,5	227	19		
66	M	80	Adenom de prostată. Cardiopatie ischemică.	6,4	14,1	134		23,7	20
67	F	48	Dislipidemie	9,98	13,9	396		34	78
68	F	60	HTA. Insuficiență cardiacă. Diabet st. II.	8,53	14	186	14	14	21
69	F	65	Gastropatie cr. Ulcer duodenal. Colecistită cr.	10,08	14,5	220	12	19	27
70	M	69	HTA. Adenom de prostată.	4,72	12,8	164		18	13
71	F	68	HTA II. Spondiloză	6,08	12,9	257		27	35
72	F	72	Metastaze osoase	4,33	12,4	316		23	23
73	F	64	HTA. Dislipidemie. Astm bronic.	5,28	14,5	275	25	57	60



**Tabel 7.4.** Data klinice studiate (mg/dl)

<b>Nr.</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>Fe</b>	<b>Ureea</b>	<b>Creat</b>	<b>Acid uric</b>	<b>Glu</b>	<b>Col</b>	<b>Tri</b>
1	9	2,24	184,9	22,2	0,88	3,62	93,7	226,2	84,7
2					1	7,1	102	215	187
3	9,62			27,4	0,6		77	204	159
4	9,5	2,22	108	19,2	0,9	3,62	87	360	248
5				29,7	0,62	5,16	147	146	145
6				37,9	0,65	5,43	110	262	105
7				32,3		5,5	112,5	231,3	304,2
8	9	2,01	80	16,8	0,91	5,49	102,3	255	64,8
9						7,9	92	172	175
10	8,72		20	35,2	0,67	5,46	92	199	207
11	10		11	28,4	0,5		81	110	
12	10,18	2,05	20,8	27,4	0,57		91	168	66
13				31,2	0,77	5,03	91	156	52
14					1	7,7	89		
15							98	297	121
16	8,5			58,2	1,11	6	104	191	119
17	9,2	2,15	99	32	0,93	6,7	77	256	139
18	9,39		16	49,7	0,77		113		
19	9,66	2,32	14	33,6	0,9	5,95	79	270	168
20	32			41,1	0,75		97	214	61
21	9,8		24	31	0,6		106		
22	10,34	2,24	30	34,4		3,62	84	169	78
23	11,03				0,91		133	192	121
24	8,7	1,63			0,9	4,9	100	187	140
25	9,57	1,67	102	28,55	0,86		124	192	116
26	8,6	1,39		0,41	0,91	6,41	132	233	150
27	9,1	1,66			0,93	6,4	118	161	98
28	9,92			25	0,91	3,2	94	282	206
29	9	1,92	13,8	23	0,71	2,62	100	318	199

<b>Nr.</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>Fe</b>	<b>Ureea</b>	<b>Creat</b>	<b>Acid uric</b>	<b>Glu</b>	<b>Col</b>	<b>Tri</b>
30	9,36	2,14	14	24,5	0,76	3,4	77	279	169
31	9,87	2,14	17	22,6	0,74	3,63	90	375	183
32				34,54	1,12	7,57	96	186	135
33	9,4						92		
34				31,9	0,65	4,4	81	193	117
35	9,1	1,87						136	92
36				31	0,86		85	213	88
37					0,73	5,4	95,9	224	193
38	8,4		62	70	1,83		96	243	133
39.	8,7			40	0,97	4,4			
40									
41	9,9			20	0,74		83		135
42	10						87		
43	2,3	0,76	20,1		0,93	2,25	61	412	176
44	9,7			25,3			87	149	85
45							86	217	76
46				17,8	0,8	3,1	83,5	154	38
47			16,3				83	234	248
48			14,27	24,9	0,71	4,2	99	195	82
49	2,39		25,75		0,63	3,6	84,9	183,6	58,3
50	9,9	1,99					82	234	140
51							78		
52	9,2	2,03	96,7	27,42	0,73	1,92	82	208	88
53	9,2	2,05	81	37,28	1,09	4,19	106	220	110
54	8,3	2,16	60	23	0,61	3,1	78	248	76
55	2,32		8,6	2,48	0,74	3,21	73	353	144
56							84		
57						6,8	92	189	285
58	2,38					3,9	86		
59	8,8		10	17,9			77		

Nr.	Ca	Mg	Fe	Ureea	Creat	Acid uric	Glu	Col	Tri
60				44,9	1,19	4,3	96	166	129
61	11	1,94	86	31	0,76	6,1	194	224	206
62					0,82		78	188	277
63							98	190	253
64							100	261	143
65					0,76	4,96	86	210	94
66							103	160	96
67				33,4			93	240	185
68				32,5	0,75	3,5	163	130	119
69	9,1			45	1,05	3,9	103	252	122
70				38	1,03	3,59	106	154	76
71					0,91		78	256	118
72	2,27		10,7	23,7	0,76		99		113
73							1		

Probele de hematologie sunt analizate din sânge venos, recoltat pe tub cu anticoagulant EDTA, tip proba: sânge

Interval biologic de referință: [121]

**WBC (white blood cells = leucocite):**

Barbati:  $4.20 - 9.20 \times 10^3/\mu\text{L}$

Femei:  $4.00 - 10.20 \times 10^3/\mu\text{L}$

**HGB (hemoglobina din sânge):**

Barbati: 13.50 – 17.40 g/dL

Femei: 11.70 – 15.70g/dL

**PLT (plachete sanguine, trombocite):**

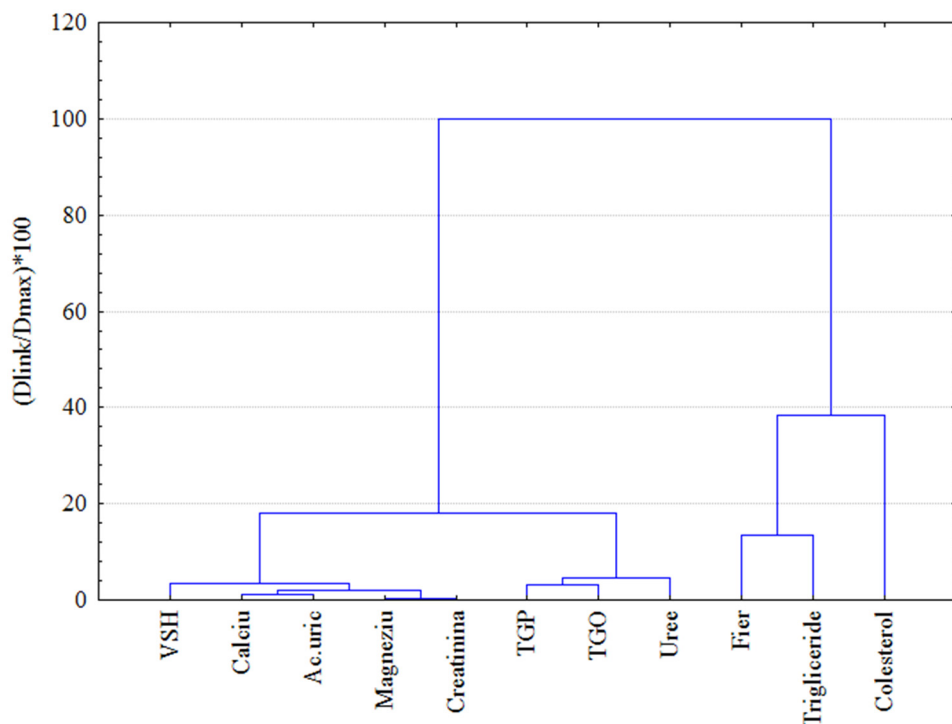
Barbati:  $140.00 - 380.00 \times 10^3/\mu\text{L}$

Femei:  $155.00 - 400.00 \times 10^3/\mu\text{L}$

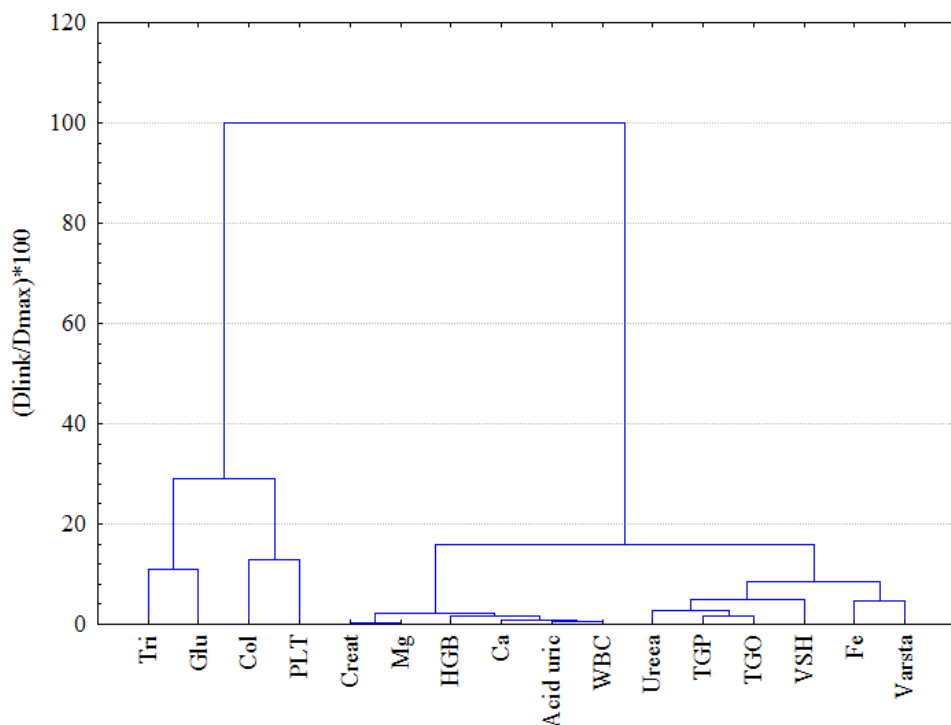
## 7.5. Rezultate și discuții

Scopul studiului a fost de a găsi modele de similitudine, atât între pacienți, cât și pentru testele clinice. Două metode clasice de chemometrie și anume analiza clusterului (CA)

și analiza principală a componentelor (PCA) au fost aplicate la evaluarea datelor clinice. Aceste metode au fost utilizate pentru a diferenția pacienții (cazurile) în funcție de sex și vârstă. Prin analiza componentelor principali s-a redus setul de date la câteva reprezentative, iar prin analiza clusterului s-au determinat diferențe și nepotriviri [110]. Analiza cluster arată gradul de corelație prin valorile ESR (VSH), Ca, Mg, Acid uric, Creatinină, TGP, TGO, Uree, Fe, Trigliceride și Colesterol. Există similitudini ale probelor de la diferiți pacienți. (Figurile 7.1, 7.2). Din analiza cluster se observă o corelație mare între magneziu și creatinină, fapt observat și de alți cercetători [114]. De asemenea, calciul și acidul uric s-au dovedit a fi puternic corelați. Există mai multe studii care au descoperit într-un procent considerabil în cazul pacienților cu oxalat, o concentrație ridicată de acid uric și de asemenea hipercalciuria [115]. Analiza cluster a demonstrat că VSH-ul este corelat cu Ca, acidul uric, creatinina și Mg, care fac VSH-ul un bun marker pentru bolile renale. Acest fapt a fost, de asemenea, dovedit clinic [116]. Foarte corelate sunt, de asemenea, enzimele TGP și TGO, enzimele transaminazelor hepatice, care se găsesc în metabolismul aminoacizilor și sunt corelate direct cu concentrația de uree.



**Fig. 7.1.** Dendrograma privind parametrii clinici considerați în studiul I. Pentru o mai bună vizualizare pe ordonată s-a reprezentat raportul  $(D_{leg}/D_{max}) \times 100$ .



**Fig. 7.2.** Dendrograma parametrilor clinici considerați în studiul II (inclusiv vârsta pacienților).  
Se observă legătura dintre vârsta pacientului și cantitatea de Fe.

Studiul a arătat o bună corelație între enzimele transaminazice, uree și VSH, Ca, Mg, acid uric, creatinină. O corelație semnificativă a fost obținută între Fe, trigliceride și colesterol.

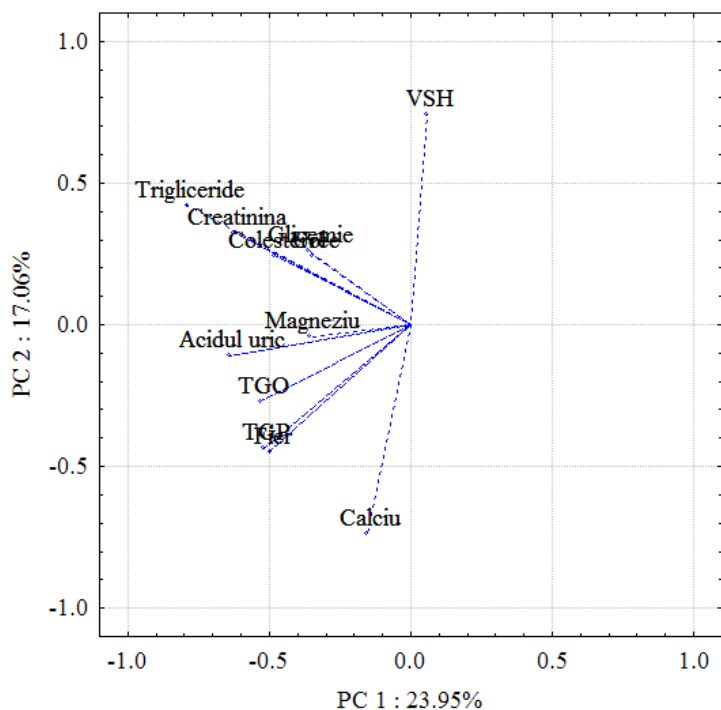
Explicația clusterizării constatate este relevantă și se bazează pe modelul similarității între nivelul glucozei, nivelul enzimelor, funcția hepatică, funcția renală. Această clasificare contribuie la optimizarea performanței datelor clinice pentru pacienți și diagnosticarea pacienților.

Figurile 7.3 și 7.4 prezintă reprezentarea grafică a parametrilor clinici considerați studiului. S-a observat o corelație bună între parametri clinici la pacienții separați în două grupe, în funcție de sex și cei separați în trei grupuri în funcție de vârstă; zona punctată definită de primii trei componenți principali (Fig. 7.6 și Fig. 7.7).

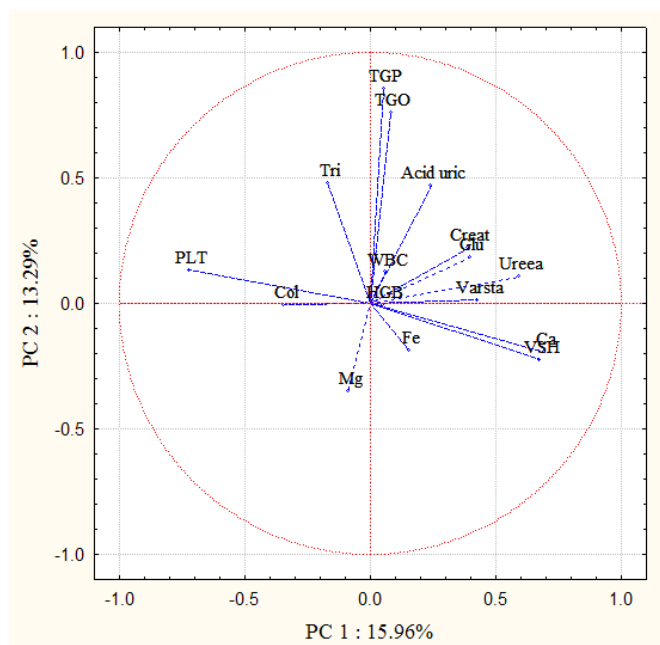
Prin PCA se pot extrage informații utile dintr-un număr mari de date care altfel nu pot fi interpretate. Aceste informații sunt valoroase pentru diagnosticare și tratament [109].

Dezvoltarea în continuare a metodelor utilizate poate oferi perspective importante pentru asistența medicală [110].

Figura 7.3 prezintă grafic parametrii clinici considerați în studiu I.

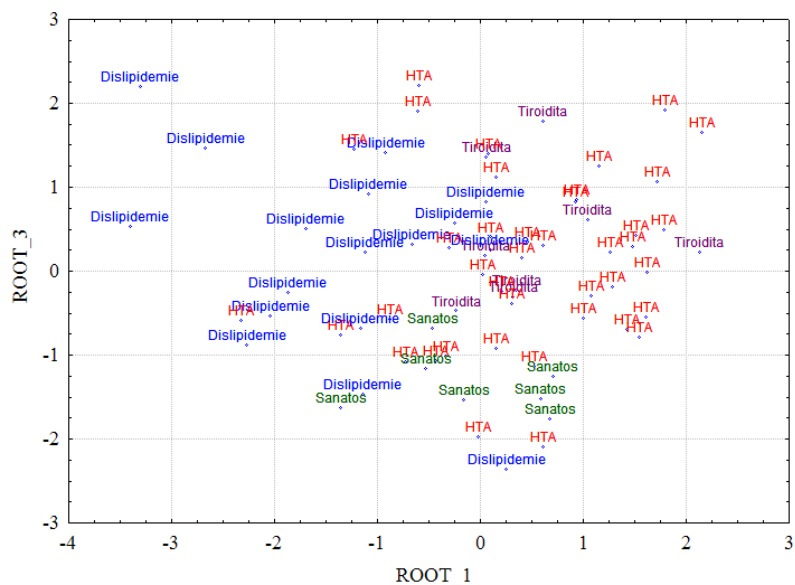


**Fig. 7.3.** Reprezentare grafică a parametrilor clinici luați în considerare studiul I

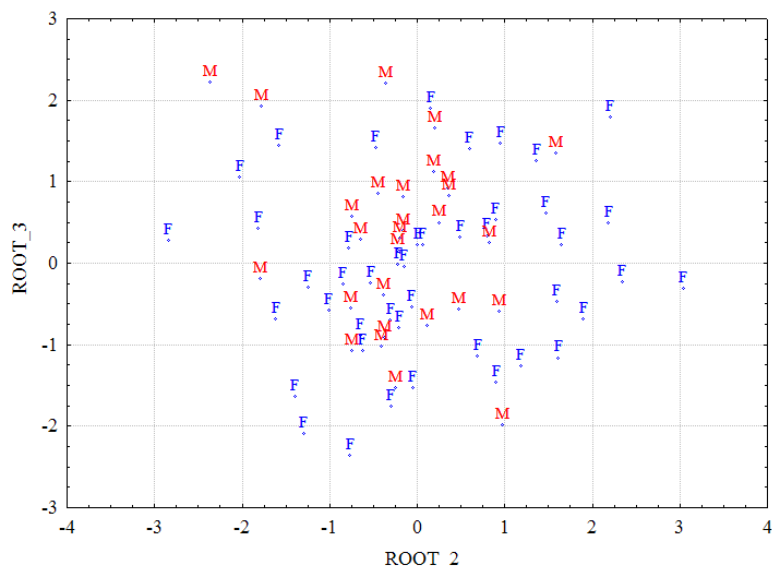


**Fig. 7.4.** Reprezentare grafică a parametrilor clinici luați în considerare în studiul II (inclusiv vârsta pacienților).

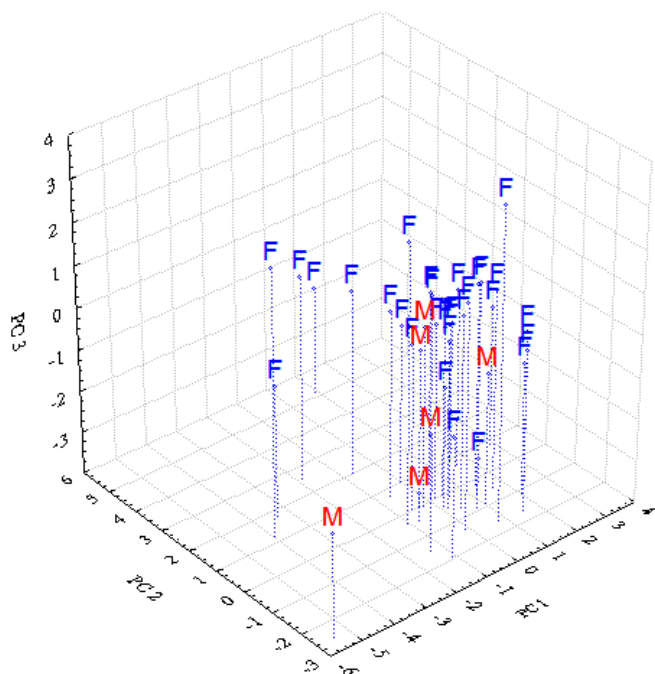
S-a observat o corelație bună între parametri clinici la pacienții separați în două grupe, în funcție de sex și cei separați în trei grupuri în funcție de vârstă; zona punctată e definită de primii trei componenți principali (Fig. 7.6 și Fig. 7.7).



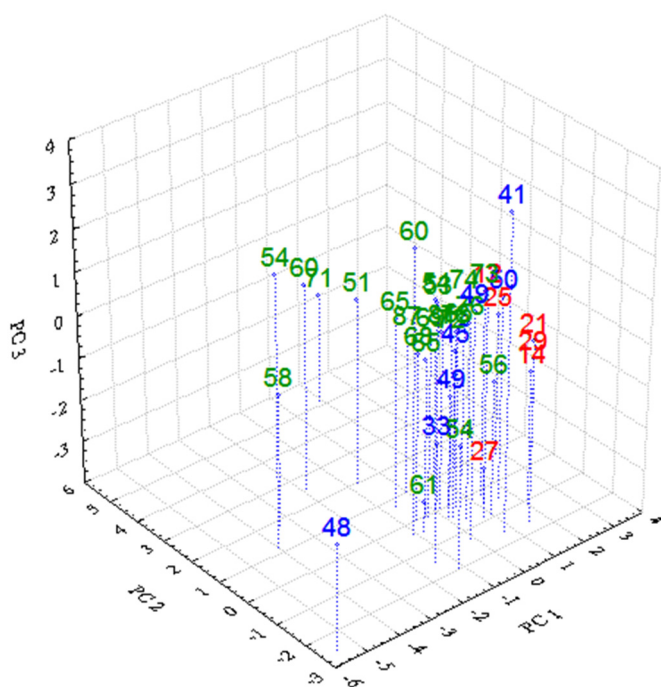
**Fig. 7.5.** Reprezentare grafică a parametrilor clinici luați în considerare în studiul II (cu specificarea diagnosticului).



**Fig. 7.6.** Reprezentarea grafică a împrăstierii datelor referitoare la sexul pacienților luați în considerare în studiul II

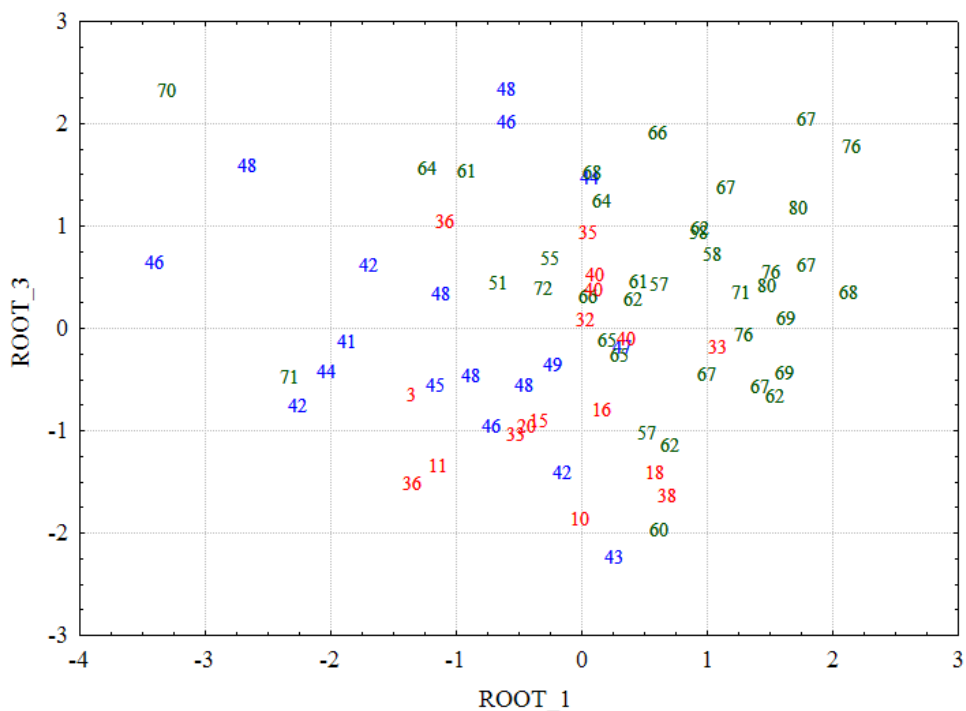


**Fig. 7.7.** Reprezentare grafică a împrăștierii datelor referitoare la sexul (studiul I)



**Fig. 7.8.** Reprezentare grafică a împrăștierii datelor privind vârsta pacienților (studiul I)





**Fig. 7.9.** Reprezentarea grafică a împrăstierii datelor referitoare la vârsta pacienților luați în considerare în studiul II

TGO (ASAT/AST) și TGP (ALAT/ALT) sunt enzime ce fac parte din clasa transaminazelor. Acestea se găsesc mai ales în ficat (în citosol), în miocard, mușchi scheletici, rinichi, și pancreas. Creșteri mari apar în hepatite virale sau toxice [119].

Determinarea nivelului colesterolului evaluează statusul lipidic și tulburările metabolice, riscul de ateroscleroză, stenoza coronariană și infarct miocardic.

Glucoza este monozaharidul important din sânge, care apare din carbohidrați și glicogen. Marker biologic mai specific pentru a defini diabetul, determinarea glucozei plasmatice a rămas elementul de bază al criteriilor de diagnostic [119].

Creșteri ale glicemiei conduc la: diabet zaharat, boala Cushing, acromegalie/gigantism, feocromocitom, adenom hipofizar (secretor de hormon de creștere), hemocromatoza, pancreatita acută/cronică, neoplasm de pancreas, glucagonom, afecțiuni renale cronice, boala hepatică avansată, deficiența de vitamina B1 (encefalopatia Wernicke), stres acut emoțional sau fizic (infarct miocardic, AVC, convulsii) [120].

Creșterea acidului uric seric conduce la insuficiența renală; gută; hiperuricemie asimptomatică (trebuie evaluată periodic pentru gută); creșterea distrucției de nucleoproteine: leucemii și sindroame mieloproliferative cronice, mielom multiplu, limfoame. [121].

Calciul este componentul mineral major al oaselor. 99% din cantitatea de calciu din organism se află în oase și dinți, care constituie un rezervor imens pentru menținerea nivelului calciului seric.

Calciul (Ca) și magneziul (Mg) sunt legate între ele, deficitul unuia influențând metabolismul celuilalt. Mg e necesar în absorbția intestinală și metabolismul calciului. Pentru evaluarea nivelului Mg e bine să se ia în considerare nivelul Ca, deficitul de magneziu determinând tetanie și convulsii, aritmii[122].

Fierul (Fe) se găsește în special în hemoglobină și mioglobină.

VSH-ul reprezintă viteza de sedimentare a eritrocitelor și evidențiază prezența unei inflamații în organism. Măsurarea și monitorizarea VSH-ului permit de asemenea urmărirea evoluției unei infecții și anemii severe. Valori scăzute ale vitezei de sedimentare a hematiilor sunt întâlnite în hepatita epidemică și stări alergice.

Hemograma completă pe analizor este o metodă rapidă și valoroasă de evaluare hematologică a pacienților și care completată cu un frotiu de sânge periferic poate pune diagnosticul în peste 90 % din afecțiunile hematologice.

Se anunță de urgență modificările ce pun în primejdie viața pacientului

- hemoglobina < 5 g/dl și > 20 g/dl.
- număr de leucocite > 30.000/mm<sup>3</sup> sau < 500/mm<sup>3</sup>;
- număr de trombocite: adulți < 40.000/mm<sup>3</sup> sau > 1000000 mm<sup>3</sup>
- număr de trombocite: copii < 20.000/mm<sup>3</sup> sau > 1000000 mm<sup>3</sup>

## 7.6. Concluzii

Rezultatele studiului nostru arată că există o corelație mare între anumiți parametri clinici (figurile 7.1 și 7.2). Rezultatele confirmă că analizele clinice combinate cu metodele chemometrice sunt utile pentru corelațiile și interpretări legate de diagnosticare.

S-a observat o corelație bună între parametri clinici la pacienții separați în două grupe, în funcție de sex și cei separați în trei grupuri în funcție de vârstă; zona punctată definită de primii trei componenți principali (Fig. 7.6 și Fig. 7.7).

Prin PCA se pot extrage informații utile dintr-un număr mari de date care altfel nu pot fi interpretate. Aceste informații sunt valoroase pentru diagnosticare și tratament [109].

Dezvoltarea în continuare a metodelor utilizate poate oferi perspective importante pentru asistența medicală. În funcție de valorile datelor analitice clinice ar trebui studiate următoarele boli: afecțiuni hepatice, tulburări lipidice, diabet, tulburări renale, etc. [99].



## Concluzii generale

Consider că dezvoltarea metodelor analitice dezvoltate și studiile aplicative din cadrul acestei lucrări reprezintă o contribuție originală în domeniul cercetărilor biomedicale și de control al alimentelor utilizând metode spectroscopice. Analiza cantitativă a conținutului de aminoacizi în alimentele studiate, a celor esențiali, este un element de originalitate.

Rezultatele experimentale obținute în urma studiilor efectuate au condus la următoarele concluzii:

- S-au determinat compuși de interes biologic activi, benefici pentru sănătatea umană, prin elaborarea și testarea metodelor de analiză din alimente (vin, semințe, plante) și monitorizarea acestora.
- S-a demonstrat că GC-MS este o tehnică de excepție prin domeniile de investigare în care își găsește aplicațiile și pentru că poate identifica structuri necunoscute.
- Metodele de analiză cantitativă utilizate au fost validate, parametrii de validare pentru liniaritate, precizie, acuratețe, limită de detecție, limită de determinare cantitativă au fost buni.
- S-au dezvoltat sau adaptat metode de analiză calitativă și cantitativă a aminoacizilor și acizilor grași din vinuri. Rezultatele au arătat puține diferențe între vinurile analizate prin compararea aminoacizilor liberi, a compușilor volatili și a activității antioxidante a șase vinuri albe din podgoria Blaj și două vinuri din alte podgorii. Conținutul mare de prolină în comparație cu alți aminoacizi este datorat tehnologiei de fermentație al argininei. Metoda GC-MS s-a dovedit a fi o metodă excelentă pentru caracterizarea vinului, cea mai indicată pentru analiza calitativă și cantitativă a componentelor organici volatili, al buchetului vinurilor și al unor principii active din vinuri.
- S-a comparat conținutul de aminoacizi și activitatea antioxidantă a unor semințe (semințe de in, mac, struguri, câneapă, nuci, dovleac, susan, pepene verde, chia, porumb, migdale și alune) utilizate ca suplimente alimentare. Metoda de diluție izotopică dezvoltată a fost precisă și simplă, utilă pentru studii de caracterizare a diferitelor extracte de semințe studiate, utilă pentru diferențierea între semințe utilizate ca suplimente nutritive. Valoare semnificativă pentru aminoacizii esențiali s-a obținut în cazul semințelor de pepene verde (datorită valorii ridicate a histidinei), în cele de câneapă, dovleac, migdale, mac și semințe de struguri. Valoarea

nutrițională exprimată prin conținutul de aminoacizi și proprietățile antioxidante a demonstrat calitatea acestora de a fi utilizate ca suplimente nutritive. S-a stabilit variația aminoacizilor liberi în diferitele probe asociate cu capacitatea lor antioxidantă.

- Spectrometria de masă cuplată cu cromatografia de gaze (GC- MS) este o tehnică potrivită pentru caracterizarea compușilor din extractele de plante. Plantele aromatice sunt utilizate pe scară largă în prepararea alimentelor și aromelor, în medicină, fiind o bună sursă de aminoacizi. Scopul investigațiilor a fost de a determina diferențele dintre plantele achiziționate din România cu privire la aminoacizii și activitatea antioxidantă a unor plante folosite adesea ca ceai sau condimente. Aminoacizii dominanți identificați în plantele studiate au fost prolina, acidul glutamic, acidul aspartic, lizina, glicina și alanina. Cea mai mare activitate antioxidantă s-a obținut pentru extractele din Rozmarin, Cimbrișor, Păducel, Salvie și Curry.
- S-au utilizat tehnici spectrofotometrice pentru dezvoltarea unei metode de diagnosticare din analiza sângelui. Scopul principal a fost efectuarea unui studiu chemometric al datelor clinice din rezultatele analitice prin utilizarea metodelor de analiză a clusterului și analiza componentelor principali (PCA). S-au găsit modele de similitudine, atât între pacienți, cât și pentru datele clinice prin Analiza Cluster (CA) și Analiza Componentelor Principali (PCA). Aceste metode au fost utilizate pentru a diferenția pacienții (cazurile) în funcție de sex, vârstă și diagnostic. Studiul a arătat o bună corelație între enzimele transaminazice, uree și VSH, Ca, Mg, acid uric, creatinină. O corelație semnificativă a fost obținută între Fe, trigliceride și colesterol. Corelația mare între anumiți parametri clinici confirmă că analizele clinice combinate cu metodele chemometrice sunt utile pentru corelații și interpretări legate de diagnosticare și tratament.

## Anexa 1

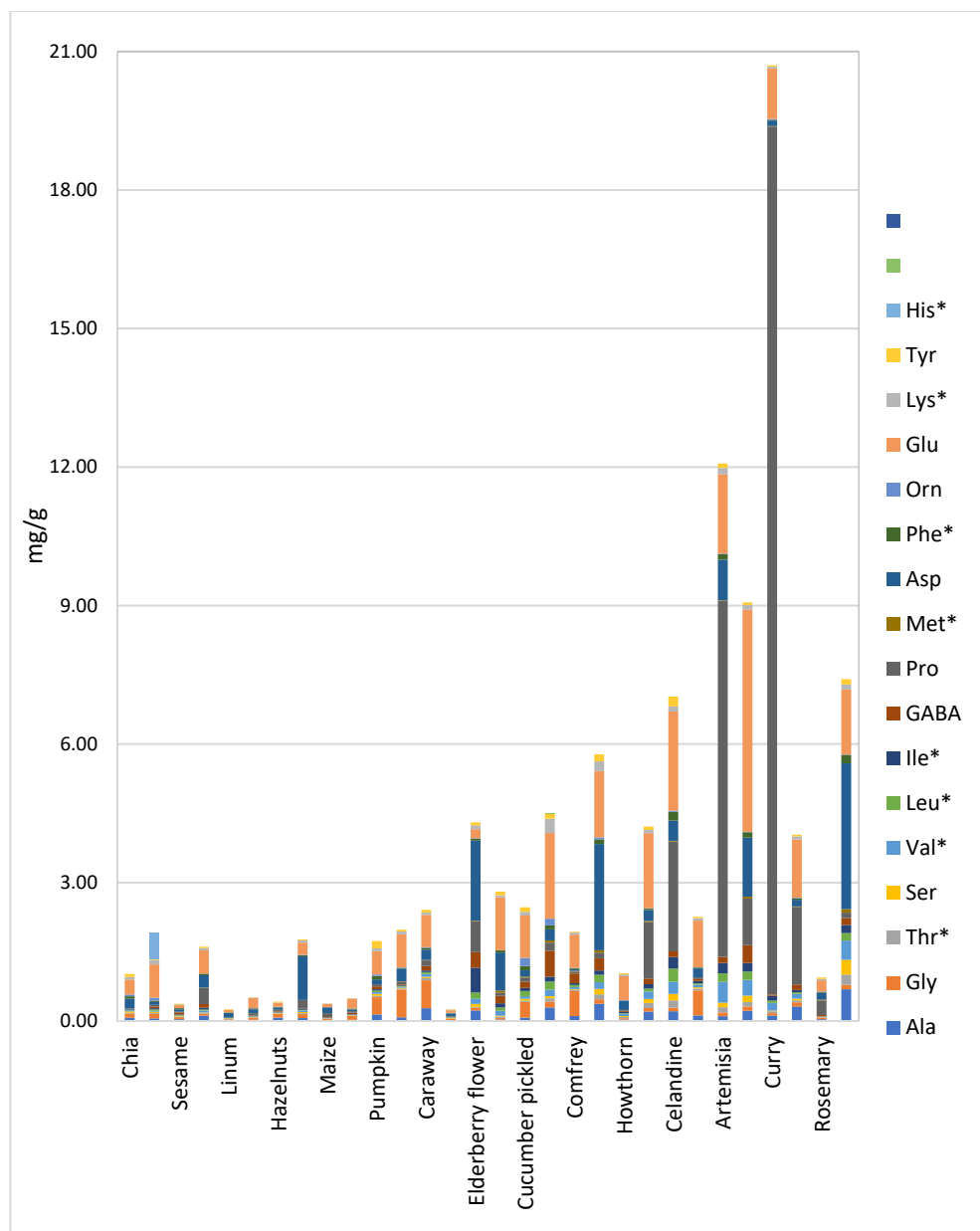


Fig. 1. Analiza comparativă a aminocizilor determinați în sămburi și plante.



# Bibliografie

- [1] M. Culea, *Spectrometrie de masă. Principii și aplicații*, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, pp. 7–11, 15–21, 41–45, 48–51, 27–28, 256–260 (2008).
- [2] I. Oprean, *Spectrometria de masă a compușilor organici*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, pp. 46, 128, (1974).
- [3] J.H. Gross, *Mass spectrometry – A textbook*, Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 154–157, 146–148, 475–480, (2004).
- [4] C. Mesaros, *Diagnosticarea prin GC- MS*, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, pp. 17–18, (2012).
- [5] M. Kussmann, F. Raymond, M. Affolter, *OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health*, Journal of Biotechnology, 124, pp. 758–787 (2006).
- [6] B.J. Thatcher, E. Caputo, Cap. 22. Biomarker discovery, *Medical Applications of Mass Spectrometry*, Editori: Karoly Vekey, Andras Telekes, Akos Vertes, Elsevier pp. 505–531 (2008).
- [7] P. Bodamer, Cap. 12. Medical laboratory practice – possibilities for mass spectrometry, *Medical Applications of Mass Spectrometry*, Editori: Karoly Vekey, Andras Telekes, Akos Vertes, Elsevier, pp. 253–259 (2008).
- [8] P. Bodamer, Cap. 12. Medical laboratory practice – possibilities for mass spectrometry, *Medical Applications of Mass Spectrometry*, Editori: Karoly Vekey, Andras Telekes, Akos Vertes, Elsevier, pp. 253–259 (2008).
- [9] M. Zeng, Y. Liang, H. Li, B. Wang, X. Chen, *A metabolic profiling strategy for biomarker screening by GC-MS combined with multivariate resolution method and Monte Carlo PLS-DA*, Analytical Methods, 3, pp. 438–445 (2011).
- [10] M.P. Quinones, R. Kaddurah-Daouk, *Metabolomics tools for identifying biomarkers for neuropsychiatric diseases*, Neurobiology of Disease, 35, pp. 165–176 (2009).
- [11] Y. Sato, I. Suzuki, T. Nakamura, F. Bernier, K. Aoshima, Y. Oda, *Identification of new plasma biomarker of Alzheimer disease using metabolomics technology*, Journal of Lipid Research, 53 (3), pp. 567–762, (2012).
- [12] [http://en.wikipedia.org/wiki/Gas\\_chromatography](http://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography)
- [13] M. Bojiță, R. Săndulescu, L. Roman, R. Oprean, *Analiza și controlul medicamentelor. Volumul 2: Metode instrumentale în analiza și controlul medicamentelor*, Ed. Intelcredo, Deva, pp. 62–63, 455–457 (2003).
- [14] R.P. W. Scott, *Principles and practice of chromatography*, Chrom-Ed Book Series, Vol. 2, pp. 1, 46–54 (2003).
- [15] S. Gocan, *Cromatografia de înaltă performanță. Partea I: Cromatografia de gaze*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, pp. 9, 10, 11, 53–55, 12–17, 29, 34, 75, 115–117, 120–128 (1998).
- [16] H.I. Nacșu, L. Jäntschi, *Chimie analitică și instrumentală*, Ed. Academic Pres & Academic Direct, Cluj-Napoca, pp. 223, 224, 201–208 (2006).
- [17] R. Oprean, E. Rozet, W. Dewé, B. Boulanger, Ph. Hubert, *Ghid de validare a procedurilor analitice cantitative*, Ed. Medicală Universitară „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, pp. 18, 19, 20–23 (2007).



- [18] A.M. Iordache, M. Culea, C. Mesaroş, I. Ştefănescu, Cap. 2, *Validarea metodelor de analiză cantitativă*, Aplicații biomedicale și ecologice prin spectrometrie de masă, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, pp. 40–43, 46–47, (2012).
- [19] H. Kaspar, *Amino acids analysis in biological fluids by GC-MS*, Teză de Doctorat, Facultatea de Chimie și Farmacie, Univ. Regensburg, pp. 6 (2009).
- [20] M.D. Rosenthal, R.H. Glew, *Medical Biochemistry: Human metabolism in health and disease*, Ed. John Wiley & Sons Inc, pp. 305 (2009).
- [21] C. Mesaros, *Diagnosticarea prin GC- MS*, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, pp. 62, 65–66 (2012).
- [22] E.O. Abu, I. Oluwatowaju, *Omega-3 index determined by gas chromatography with electron impact mass spectrometry*, Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 80, pp. 189–194 (2009).
- [23] T.I. POP, *Valorificarea produselor secundare viti-vinicole*, Ed. Academic Press, Cluj-Napoca, pp. 164 (2015).
- [24] R.D. Boc, A. Dobrei, *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 19 (2), pp. 190 (2015).
- [25] <http://www.crameromania.ro/en//en/wineries/jidvei-winery-mysterium-188.html>
- [26] Y. Bouzas-Cid, E. Falqué, I. Orriols, E. Trigo-Córdoba, E. Díaz-Losada, D. Fornos-Rivas, J.M. Mirás-Avalos, *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 30 (2), pp. 84 (2015).
- [27] E. Soto Vazquez, S. Rio Segade, S. Cortes Dieguez, *International Journal of Food Science and Technology*, 46 (3), pp. 542 (2011).
- [28] E. Bouloumpasi, E.H. Soufleros, C. Tsarchopoulos, C.G. Biliaderis, *Vitis*, 41 (4), pp. 195 (2002).
- [29] L. Jaitz, K. Siegl, R. Eder et al., *Food Chemistry*, 122 (1), pp. 366 (2010).
- [30] P. Hernandez-Orte, M.J. Ibarz, J. Cacho, V. Ferreira, *Chromatographia* 58, pp. 29 (2003).
- [31] Purificación Hernández-Orte, Juan F. Cacho, and Vicente Ferreira, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50 (10), pp. 2891 (2002).
- [32] V. Avram, C G. Floare, A Hosu, C. Cimpoi, C. Măruțoiu, Z. Moldovan, *Analytical Letters*, 48, pp. 1099, (2015).
- [33] S.Y. Shu, J.G. Wen, Z. Yu Ping, *Food Chemistry*, 127, pp. 547 (2011).
- [34] K.W. Lee, H.J. Hur, H.J. Lee, C.Y. Lee, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp. 1990 (2005).
- [35] K.M. Yoo, M. Al-Farsi, H. Lee, H. Yoon, C.Y. Lee, *Food Chemistry*, 123, pp. 734, (2010).
- [36] R. Bleiziffer, S. Suvar, P. Podea, C.Mesaros, M.Culea, *Blaj white wines characterization*, STUDIA UBB CHEMIA, LXII, 3, pp. 123–132 (2017).
- [37] M. Culea, D.L. Hachey, *Determination of Multiply Labeled Serine and Glycine Isotopomers in Human Plasma by Isotope Dilution Negative Chemical Ionization Mass Spectrometry*, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 9, pp. 655–659, (1995).
- [38] A. Iordache, E. Horj, A.R. Ani, C. Mesaros, S. Morar, O. Cozar, M. Culea, *Amino Acids Profiles In Biological Media*, AIP Conference Proceedings, 1262, pp. 192–197, (2010).
- [39] A. Iordache, E. Horj, A. Toma, O. Cozar, M. Culea, *Amino acid determination of two carp species by GC-MS*, Asian Journal of Chemistry, 23 (11), pp. 4757–4760, (2011).
- [40] E. Horj, A. Iordache, A. Toma, O. Cozar, M. Culea *Fatty acid composition of two carp species by GC-MS*, Asian Journal of Chemistry, 23 (11), pp. 4768–4770 (2011).

- [41] S.H. Eom, W.J. Cheng, J.P. Hyoun, E.H. Kim, M.I. Chung, M.J. Kim, C.Y. Yu, D.H. Cho, *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 15, pp. 319, (2007).
- [42] B. Zoecklin, K. Fugelsang, B. Gump, F. Nury, *Wine Analysis and Production Chapman & Hall New York*, (1995).
- [43] D. Komes, D. Ulrich, K. Kovacevic Ganic, T. Lovric, *Vitis*, 46 (2), pp. 77, (2007).
- [44] G. Brufau, J. Boatella, M. Rafecas, *Nuts: source of energy and macronutrients*, British J. Nutr. 96, pp. 24–28, (2006).
- [45] I.U. Karaye, A.A. Aliero, S. Muhammad, L.S. Bilbis, *Pak J Nutr.*, 11, pp. 1161–1165 (2012).
- [46] M. Culea, S. Scrob, S. Suvar, P. Podea, I. Has, S. Muste, *Anal Lett.*, 48, pp. 37–46 (2015).
- [47] D. Aiello, D. De Luca, E. Gionfriddo, A. Naccarato, A. Napoli, E. Romano, A. Russo, G. Sindona și A. Tagarelli, *Spectrometrie de masă în mai multe etape în calitate, siguranță și originea alimentelor*, Eur. J. Spectrometria de masă. 17, 1 (2011).
- [48] V. Cunsolo, S. Fotti și R. Saletti, *Spectrometria de masă în caracterizarea proteinei de semințe*, Eur. J. Mass Spectrom. 10, 359 (2004).
- [49] E.S. Chernetsova, A.N. Shikov, E.A. Crawford, S. Grashorn, I. Laakso, O.N. Pozharitskaya, V.G. Makarov, R. Hiltunen, B. Galambosi și G.E. Morlock, *Scrisoare: Caracterizarea compușilor volatili și semivolatili în frunzele verzi și fermentate de *Bergenian crassifolia* L. prin cromatografie în fază gazoasă - spectrometrie de masă și Analiza directă ID-CUBE în rezoluție înaltă în timp real spectrometrie de masă*, Eur. J. Spectrometria de masă. 20, 199 (2014).
- [50] C. Botineștean, N.G. Hădărugă, D.I. Hădărugă și I. Jianu, *Compoziția acizilor grași prin cromatografie în fază gazoasă - spectrometrie de masă (GC-MS) și cea mai importantă parametrii chimici fizici ai uleiului de tomate*; J. Agroaliment. Proc. Technol. 18 (1), pp. 89, (2012).
- [51] S. Suvar, E. Horj, P. Podea, A. Iordache, D. Cocan și D. Cocan, M. Culea, *Determinarea acizilor grași în plasma de păstrăv și carne de câtre GC-MS*, Studia UBB Chemia, LX, 2, 109 (2015).
- [52] S. Suvar, A.M. Iordache, C. Voica, Roxana E. Ionete, R. Bleiziffer și M. Culea, *Comparația compoziției nutrienților a unor uleiuri vegetale*, Ceh Chem. Soc. Symp.Ser. 13, 146 (2015).
- [53] A. Iordache, M. Culea, E. Horj și O. Cozar, *Determinarea aminoacizilor și a seleniului în pești plasmă*, Rom. J. Phys. 56, 963 (2011).
- [54] E. Horj, A. Iordache, A. Toma, O. Cozar și M. Culea, *Compoziția acidului gras a două specii de crap de către GC-MS*, Asian J. Chem. 23, 4768 (2011).
- [55] D.Cocan, E.Horj, M.Culea, V.Miresan și A. Pintea, *Variația acidului gras liber în păstrăvul curcubeu (*Oncorhynchus mykiss*) în timpul sezonului primăvară-vară*, Bull. USAMV CN 67, 137 (2010).
- [56] I. Geana, A. Iordache, R.E. Ionete, A. Marinescu, A. Ranca și M. Culea, *Analiza multi-elemente ICP-MS a unor vinuri românești și solurile lor de proveniență pentru determinarea originii geografice*, Food Chem. 138, 1125 (2013).
- [57] Murad, G.R. Vianna, A.M. Machado, N.B. da Cunha, C.M. Coelho, V.A. Lacerda, M.C. Coelho și E.L. Rech, *Caracterizarea prin spectrometrie de masă a acizilor grași din semințe de soia modificate metabolic*, Anal. Bioanal. Chem. 406, 2873 (2014)
- [58] A.S. Al-Khalifa, *Caracteristicile fizico-chimice, compoziția acizilor grași și activitatea lipoxigenazei uleiurilor brute de dovleac și semințe de pepene galbenă*, J. Agric. Food Chem. 44, 964 (1996).
- [59] M. Careri, F. Bianchi și C. Corradini, *Progrese recente în aplicarea spectrometriei de masă în analiza alimentelor*, J. Chromatogr. A 970, 3 (2002).

- [60] E.D. Dodds, M.R. McCoy, L.D. Rea și J.M. Kennish, *Cuantificarea prin cromatografie în gaz a esterilor metilici ai acizilor grași: detecția ionizării în flacără față de spectrometria de masă cu impact de electroni*, *Lipids* 40, (2005) pp. 419.
- [61] U. Hicksonmez, C. Ozdemir, S. Cam, A. Ozdemir și F.S. Erees, *Analiza elementelor majore-minore în unele semințe de plante consumate ca hrană în Turcia*, *Nat. Sci.* 4, 298 (2012).
- [62] Z. Asemi, A. Soleimani, F. Bahmani, H. Shakeri, N. Mazroii, F. Abedi, M. Fallah, A.A Mohammadi și A. Esmailzadeh, *Efectul suplimentării cu acid gras omega-3 plus vitamina E asupra scorului global de evaluare subiectiv, a metabolismului glucozei și a concentrațiilor lipidice la pacienții cu hemodializă cronică*, *Molec. Nutr. Food Res.* 60, 390 (2016).
- [63] A. Bratu, M. Mihalache, A. Hanganu, N.A. Chira, M.-C. Todarescu și S. Roesca, *Determinarea cantitativă a acizilor grași din uleiurile de pește folosind metoda GC-MS și spectroscopia 1H-RMN*, *U.P.B. Sci. Bull., Seria B* 75 (2), pp. 23, (2013).
- [64] <http://www.whfoods.com/genpage.php?tname=foodspice&dbid=81>
- [65] R.C. Zambiasi, R. Przybylski, M. Weber Zambiasi și C.B. Mendonça, *Compoziția acizilor grași ai uleiurilor și grăsimilor vegetale*, *B.CEPPA, Curitiba* 25, pp. 111 (2007).
- [66] U. Chukwuemeka, G.I. Ndukwe și T.O. Audu, *Compararea profilului acizilor grași al unor pești marini proaspeți*, *Internet J. Food Safety* 10, pp. 9 (2008).
- [67] *Analiza FAME a analizelor GC de înaltă rezoluție ale metiliclor de acid gras - note de aplicație*, online la: <http://www.restek.com/pdfs/59584B.pdf>
- [68] A. Grady, *100 leacuri pentru 100 de boli*, Gemma Pres, București, pp. 227–249, (2001).
- [69] C. Parvu, *Universul plantelor*, Ed. Enciclopedica, pp. 221–222, (1991).
- [70] Y. Lu, B. Gao, P. Chen, D. Charles, L. Yu, *Food Chemistry*, 154, pp. 262, (2014).
- [71] Z. Sun, H. Wang, J. Wang, L. Zhou, P. Yang, *PLOS ONE*, 9 (12), (2014).
- [72] D.O. Kennedy, E.L. Wightman, *Avansuri în Nutriție: O revizuire internațională*. Jurnal, 2, pp. 32, (2011).
- [73] S. Akhondzadeh, M. Noroozian, M. Mohammadi, S. Ohadinia, A.H. Jamshidi, M. Khani, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 28, pp. 53, (2003).
- [74] S. Vogl, P. Picker, J.Mihaly-Bison și colab., *Journal of Ethnopharmacology*, 149, pp. 750 (2013).
- [75] M. Culea, E. Horj, A. Iordache, O. Cozar, *Asian Journal of Chemistry*, 23 pp. 4279(2011).
- [76] C. Mesaros, M. Culea, A. Iordache, O. Cozar, *Buletinul UASVM Agricultura*, 66, pp. 111, (2009).
- [77] J.I. Brauman, *Spectral Analysis: Methods and Techniques*, Ed. de J.A. Blackburn, Marcel Dekker, New York, (1970).
- [78] M. Culea și D.L. Hachey, *Rapid Communication in Spectrometry Mass*, 9, pp. 655 (1995).
- [79] T. Hodisan, M. Culea, C. Cimpoiu, A. Cot, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical, Analiza*, 18, pp. 319 (1998).
- [80] M. Culea, S. Scrob, S. Suvar, P. Podea, I. Has, S. Muste, *Scrisori analitice*, 48, pp. 37, (2015).
- [81] Cocan, E. Horj, M. Culea, V. Miresan, A. Pintea, *Buletinul USAMV, Cluj-Napoca, Agricultură*, 67, pp. 132 (2010).
- [82] A. Iordache, M. Culea, E. Horj, O. Cozar, *Jurnalul Român de Fizică*, 56, 7- 8, pp. 963 (2011).
- [83] A. Pintea, A. Varga, P. Stepnowski, C. Socaciu, M. Culea, H.A. Diehl, *Fitochimic Anaysis*, 16, pp. 188 (2005).
- [84] M.D. Huynh, D.D. Kitts, *Food Chemistry*, 114, pp. 912, (2009).

- [85] U. Chukwuemeka, G.I. Ndukwe, T.O. Audu, *Internet Journal of Food Safety*, 10, 9 (2008).
- [86] N.M. Arat, I.H. Halilo lu, Ö. Ayik, *Jurnalul turc al științelor veterinare și animale*, 27, (2003).
- [87] A.V. Pop, M. Tofan, S.A. Socaci, D. Vârban, M. Nagy, Maria-D.Bor, S. Sfechi, *Buletin UASVM Știința și tehnologia alimentară*, 72, pp. 210, (2015).
- [88] I. Hamrouni-Sellami, F.Z. Rahali, I.B. Rebey și colab., *Food Bioprocess Technology*, 6, pp. 806 (2013).
- [89] A. Benabdallah, C. Rahmoune, M. Boumendjel, O. Aissi, C. Messaoud, *Asiatic Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6 (9), pp. 760–766 (2016).
- [90] F. Al-Juhaimi, K. Ghafoor, *Pakistan Journal of Botany*, 43 (4), pp. 2235, (2011).
- [91] L. Vlase, D. Benedec, D. Hanganu, G. Damian, I. Csillag, B. Sevastre, A. Mot, R. Silaghi-Dumitrescu, I. Tilea, *Molecule*, 19, pp. 5490–5507, (2014).
- [92] B. Kaurinovic, M. Popovic, S. Vlaisaljevic, S. Trivic, *Molecule*, 16, pp. 7401–7414, (2011).
- [93] V. Nădășan, *Incursiune în fitoterapie*, Editura Viață și sănătate, (2014).
- [94] G. Bâlțeanu, *Fitotehnie*, Editura Ceres, București, (1993).
- [95] M. – E. Ceașescu, Gabriela Doru & Ileana Bereșiu, *Plante aromatice și condimentare utilizate în preparatele culinare*, Editura Ceres, (1989).
- [96] T. Kourti, J.F. MacGregor, *Process analysis, monitoring and diagnosis using multivariate projection methods*, *Chemometr Intell Lab*, 28:3–21 (1995)
- [97] N. A. Dang, Janssen H. G., Kolk A. H. *Rapid diagnosis of TB using GC-MS and chemometrics*. *Bioanalysis*. 5 (24): 3079–3097, (2013).
- [98] R. Madsen, T. Lundstedt, J. Trygg, *Chemometrics in metabolomics--a review in human disease diagnosis*. *Anal Chim Acta*. 5; 659 (1–2): 23–33, (2010).
- [99] C. Sârbu, H.F. Pop, R. Elekes, G. Covaci, *Intelligent Disease Identification based on Discriminant Analysis of Clinical Data*, *Rev Chimie*, 59: 1237–1241 (2008).
- [100] *Romanian Statistical Review - Supplement nr. 8/2015*.
- [101] I. Geana, A. Iordache, R. Ionete, A. Marinescu, A. Ranca, Culea M. *Geographical origin identification of Romanian wines by ICP-MS elemental analysis*. *Food Chem.* (2013) 13:1125–113.
- [102] K.R. Beebe, R.J. Pell, M.B. Seasholtz. *Chemometrics: A Practica 1 Guide*, John Wiley& Sons, New York (1998).
- [103] D.L. Massart, L. Kaufman, *The interpretation of Cchemical Data By the Use of Cluster Analysis*, John Wiley & Sons, New York. (1983).
- [104] D. Zuba, and A. Partczewski (eds.), C. Sârbu, *Fuzzy Clustering and its Applications in Chemistry in Chemometrics: Methods and Applications*, Institute of Forensic Research Publishers, Kraków,, Chapt. 1, 17–47 (2006).
- [105] S. Vyas, L. Kumaranayake, *Constructing socio-economic status indices: how to use principal components analysis*, *Health Policy Plan*. 21 (6): 459–468 (2006).
- [106] L. Faes, G. Nollo, M. Kirchner, E. Olivetti, F. Gaita, R. Riccardi, R. Antolini, *Principal component analysis and cluster analysis for measuring the local organisation of human atrial fibrillation*, *Med Biol Eng Comput*. 39 (6): 656–63 (2001).
- [107] H.J. Sih, D.P. Zipes, E.J. Berbari, J.E. Olgin, *A high-temporal resolution algorithm for quantifying organization during atrial fibrillation*, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 46:440–450, (1999).
- [108] B. Vandeginste, D.L. Massart, L. Buydens, S. De Long, P. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Elsevier, Amsterdam, (1998).

- [109] M. Stone, X. Liu, H. Chen, J.L. Prince, *A preliminary application of principal components and cluster analysis to internal tongue deformation patterns*. Comput Methods Biomech Biomed Engin.; 13(4): 493–503 (2010).
- [110] A. Buciński, T. Bączek, T. Waśniewski, M. Stefanowicz, *Clinical data analysis with the use of artificial neural networks (ANN) and principal component analysis (PCA) of patients with endometrial carcinoma*, Rep Pract Oncol Radiother, 10(5): 239–248, (2005).
- [111] M.E. Kutcher, A.R. Ferguson, M.J. Cohen, *A principal component analysis of coagulation after trauma*, J Trauma Acute Care Surg, 74 (5): 1223–1230 (2013).
- [112] T. Konishi, *Principal component analysis for designed experiments*. BMC Bioinformatics 16 (Suppl 18) (2015).
- [113] J. R. Denery, A.A. K. Nunes, M.S. Hixon, J. Tobin, T.J. Dickerson, K.D. Janda, *Metabolomics-Based Discovery of Diagnostic Biomarkers for Onchocerciasis*, PLOS Neglected Tropical Diseases 4, 384:1–9 (2010).
- [114] N. Vinayavekhin, E.A. Homan, A. Saghatelian, *Exploring disease through metabolomics*, ACS Chem Biol 5: 91–103, (2010).
- [115] J. Cunningham, M. Rodríguez, P. Messa, *Magnesium in chronic kidney disease Stages 3 and 4 and in dialysis patients*, Clin Kidney J., 5: 39–51, (2012).
- [116] F.L. Coe, *Uric acid and calcium oxalate nephrolithiasis*, Kidney International, 24:392–403, (1983).
- [117] G. Stojan, H. Fang, L. Magder, M. Petri, *Erythrocyte sedimentation rate is a predictor of renal and overall SLE disease activity*, Lupus, 22:827–834, (2013).
- [118] <https://livadacuceai.ro>
- [119] F. Fischbach. Chemistry studies, *In A Manual of Laboratory and Diagnostic Tests*. Lippincott Williams & Wilkins, USA, 8 Ed., 324–330, (2009).
- [120] Laborator Synevo. *Referintele specifice tehnologiei de lucru utilizate* (2010).
- [121] J. Wallach, *Analizele de sange în interpretarea testelor de diagnostic*. Editura Stiintelor Medicale, Romania, 7 ed., pp. 49–51, (2001).
- [122] Laboratory Corporation of America. *Directory of Services and Interpretive Guide. Magnesium, Serum*. www.labcorp.com (2010).
- [123] R. Bleiziffer, M. Culea, C. Sarbu, P. Podea, S. Suvar, A. Iordache, C. Mesaros, *Classical Chemometrics Methods Applied for Clinical Data Analysis*, Springer International Publishing AG 2017 39, S. Vlad and N.M. Roman (eds.), *International Conference on Advancements of Medicine and Health Care through Technology; 12th - 15th October 2016, Cluj-Napoca, Romania*, IFMBE Proceedings 59, pp. 39–42, DOI: 10.1007/978-3-319-52875-5\_9
- [124] S. Suvar, R. Bleiziffer, P. Podea, A. Iordache, C. Voica, Zgavarogea and M. Culea, *A comparative mass spectrometric study of fatty acids and metals in some seed extracts*, Eur. J. Mass Spectrom. 22, 253–260 (2016).
- [125] Ș.-A. IONESCU, *Clusterizarea ierarhică cu aplicații în analiza fi nanciară*, Revista Română de Statistică - Supliment nr. 8, 3–14 (2015).
- [126] <http://www.nonlinear.com/support/progenesis/comet/faq/v2.0/dendrogram.aspx>
- [127] [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43411/1/WHO\\_TRS\\_935\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43411/1/WHO_TRS_935_eng.pdf), Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a jointFAO/WHO/UNU expert consultation, Geneva, Switzerland, WHO technical report series; no. 935. (2002).



ISBN: 978-606-37-0589-2